

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Fehérje módosító enzimek vizsgálata *Drosophila* fajokban**

**Kerekes Éva**

**Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2015**

# Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	4
2.	Bevezetés.....	5
3.	Irodalmi áttekintés.....	7
3.1	Fehérjék poszttranszlációs módosításai.....	7
3.2	Foszforiláció, defoszforiláció - kinázok, foszfatázok.....	8
3.3	A foszfatázok csoportosítása .....	9
3.4	A foszfoprotein foszfatázok .....	10
3.5	A protein foszfatáz 1 (PP1) .....	11
3.5.1	A protein foszfatáz 1 katalitikus alegységei.....	11
3.5.2	A protein foszfatáz 1 regulátor alegységei .....	12
3.6	A PP1 szerepe a glikogén anyagcserében .....	13
3.7	A glikogén anyagcsere szabályozása <i>Drosophila melanogaster</i> -ben.....	14
3.8	A fehérjék proteolízise .....	18
3.8.1	A kalpainok .....	18
4.	Célkitűzések .....	20
5.	Anyagok és módszerek.....	21
5.1	Anyagok .....	21
5.1.1	<i>Drosophila</i> törzsek .....	21
5.1.2	Vegyszerek.....	23
5.1.3	Oligonukleotid primerek .....	23
5.1.4	Antitestek.....	24
5.1.5	Táptalajok.....	26
5.1.6	Oldatok, pufferek.....	26
5.2	Módszerek .....	27
5.2.1	Módszertani előzmények.....	27
5.2.2	Nukleinsav vizsgáló módszerek .....	27
5.2.3	Fehérje munkák .....	29
5.2.4	Immunológiai módszerek .....	31
5.2.5	Biokémiai mérések .....	32
5.2.6	Biológiai vizsgálatok.....	32
5.2.7	Bioinformatikai analízis .....	33
6.	Eredmények.....	34
6.1	Glikogénkötő foszfatáz alegységek jellemzése .....	34
6.2	A <i>Drosophila</i> Gbs-70E biokémiai vizsgálata.....	35

6.2.1	Fehérje kölcsönhatások kimutatása élesztő kéthibrid kísérletekkel .....	35
6.2.2	A PP1c és Gbs-70E közötti kölcsönhatás megerősítése .....	37
6.2.3	A Gbs-70E glikogénkötő képességének kimutatása.....	39
6.2.4	A Gbs-70E hatása a protein foszfatáz 1 aktivitására .....	40
6.3	A <i>Gbs-70E</i> gén expressziójának vizsgálata.....	42
6.3.1	A <i>Gbs-70E</i> gén expressziója a <i>Drosophila</i> egyedfejlődése során.....	42
6.3.2	A <i>Gbs-70E</i> gén expressziója a kifejlett nőstény <i>Drosophila</i> testrészeiben .....	43
6.3.3	A <i>Gbs-70E</i> expressziós mintázat evolúciója .....	44
6.4	A <i>Gbs-70E</i> funkciójának meghatározása genetikai vizsgálatokkal.....	47
6.4.1	<i>Gbs-70E</i> deléciós mutánsok létrehozása .....	47
6.4.2	A <i>Gbs-70E</i> funkcionális vizsgálata .....	50
6.4.3	<i>Gbs-70E</i> expresszió RNS interferenciával történő csendesítése .....	52
7.	Megbeszélés .....	55
7.1	A <i>Drosophila</i> PP1 glikogénkötő alegysége, a <i>Gbs-70E</i> fehérje jellemzése.....	55
7.2	A <i>Gbs-70E</i> gén expressziós mintázata .....	60
7.3	A <i>Drosophila</i> <i>Gbs-70E</i> funkciói .....	60
8.	Összefoglalás.....	64
9.	Summary .....	65
10.	Irodalomjegyzék.....	66
11.	Elektronikus hivatkozások.....	78
12.	Tárgyszavak.....	79
13.	Köszönetnyilvánítás .....	80
14.	Publikációs jegyzék .....	81
15.	Függelék .....	83

# 1. Rövidítések jegyzéke

AMPER = ammónium-perszulfát

bp = bázispár

BSA = borjú szérum albumin

cDNS = komplementer DNS

DEPC = dietil-pirokarbonát

dNTP = dezoxi-nukleozid-trifoszfát

DTT = ditio-treitol

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

PBS = foszfát puffereelt sóoldat (phosphate buffered saline)

PCR = polimeráz-lánreakció

PMSF = fenilmetilszulfonil-fluorid

PTM = poszttranszlációs módosítás

RT = reverz-transzkriptáz

SDS = nátrium-dodecil-szulfát

TBS = Tris puffereelt sóoldat (Tris buffered saline)

TEMED = tetrametil-etiléndiamid

Tris = Tris-(hidroxi-metil)-amino-metán

## 2. Bevezetés

A sejtekben található fehérjék legnagyobb része transláció után kémiai módosításon esik át. Ezeket a folyamatokat összefoglalóan poszttranszlációs módosításoknak nevezzük. A módosítások hozzásegítik a fehérjéket funkciójuk elnyeréséhez, kölcsönhatásaik kialakításához vagy működési helyük eléréséhez (Walsh, 2006). Lehetnek reverzibilisek vagy irreverzibilisek attól függően, hogy a kémiai módosítás visszafordítható-e, az adott csoport eltávolítható-e a fehérjéről. A reverzibilis modifikációk közé soroljuk a foszforiláció, poli-ADP riboziláció, ubikvitinálás, glikoziláció, karboxiláció, nitrozilálás, hidroxiláció, acetiláció, és a palmitoiláció folyamatát. Irreverzibilis módosítások közé tartozik a proteolízis, preniláció, mirisztoiláció, vagy az izopeptidkötések kialakítása.

Munkánk során a foszforilációs módosítások vizsgálatát végeztük *Drosophila melanogaster* modellszervezetben. A kináz enzimek által végzett foszforiláció során egy foszfátcsoport kerül a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncára, a foszfatázok az ellentétes folyamatot, a defoszforilációt katalizálják. A glikogén metabolizmusban szerepet játszó foszforiláz kináz (Fischer és Krebs, 1955) felfedezésével bizonyították először az enzimaktivitás foszforilációval történő regulációját. Az azóta eltelt években fény derült arra, hogy a foszforiláció az egyik legfontosabb reverzibilis poszttranszlációs módosítási típus, szerepét leírták többek között a sejtciklus, a növekedés, az apoptózis és számos jelátviteli folyamat szabályozásában.

A glikogén fontos állati tartaléktápanyag, lebontási és felépítési folyamatai összetett szabályozás alatt állnak. A glikogén anyagcsere enzimeinek egy része, a glikogén szintetáz, glikogén foszforiláz és foszforiláz kináz foszforilációval szabályozható, defoszforilációjukat a protein foszfatáz 1 (PP1) végzi. A PP1 az általa végzett sokféle feladatot a konzervált katalitikus alegységeinek az adott folyamatra jellemző regulátor alegységeivel létrehozott holoenzimeivel képes elvégezni (Kókai és mtsai., 2008). A foszforilációs folyamatok vizsgálata során figyelmünk a *Drosophila* protein foszfatáz 1-re, és feltételezett glikogénkötő alegységeire irányult. Jelenlegi munkánkkal a *Drosophila* glikogén anyagcsere, és ezen belül a *Drosophila* PP1 eddig még nem jellemzett regulátor alegységeinek részletesebb leírásához szeretnénk hozzájárulni.

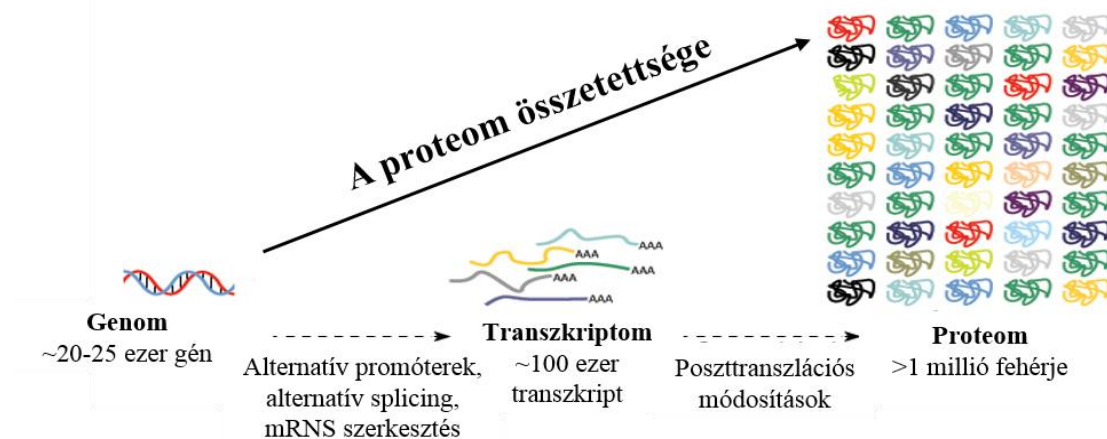
Munkánkhoz a *Drosophila melanogaster* modellszervezetet használtuk, ami a biológiai kutatások kedvelt modell organizmusa, klasszikus és molekuláris genetikai módszerekkel történő manipulálása több évtizedes múltra tekint vissza. 2000-re teljes genom szekvenciája ismertté vált, a fehérjéket kódoló génszekvenciák ismerete a kódolt fehérjék összehasonlítását és homológ fehérjék azonosítását teszi lehetővé. A *Drosophila* homológ fehérjék kisebb száma és a genetikai beavatkozások széles tárháza miatt az egyes fehérjék funkciói könnyebben vizsgálhatók ebben az organizmusban, mint az emlős modellekben. A klasszikus genetikai módosítások felhasználásával (pld. egy mozgékony P-elemet tartalmazó törzsből transzpozáz enzimet expresszáló törzzsel való keresztezéssel a P-elem eltávolítható, és így deléciós mutánsok hozhatók létre) illetve molekuláris biológiai módszerekkel (pld. az UAS/Gal4 rendszer segítségével specifikus RNS interferencia törzsek hozhatók létre) előállított funkcióvesztéses és géncsendesített mutánsok segítségével az egyes gének szerepe jól tanulmányozható.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Fehérjék poszttranszlációs módosításai

A humán genomban lévő fehérjét kódoló gének száma 20 és 25 ezer közé tehető, míg a humán proteom, vagyis a fehérjék összessége a sejtekben, egy milliónál több fehérjéből áll. A gének számához képest a fehérjék nagy számának egyik oka a transzkripció folyamata során lezajló alternatív szerkesztésben, másik oka az átíródott fehérjék transzláció utáni módosításában keresendő. A poszttranszlációs módosítás (PTM) a fehérje „életének” bármelyik szakaszában végbemehet: például közvetlenül a transzláció után a megfelelő folding elősegítésére vagy a célkompartmentbe való jutáshoz; működési helyének elérése után biológiai aktivitásának befolyásolásához; vagy degradációjának elősegítéséhez. A humán proteom körülbelül 5 % - a kódol poszttranszlációs módosítást végrehajtó enzimet, amelyek nagyjából 200 féle PTM típusban vesznek részt (Walsh, 2006).

Az 1. ábrán látható, hogy számos típusa révén a PTM megsokszorozza a sejt funkcionálisan különböző fehérjeinek számát, ezáltal segíti elő a szervek, szövetek fehérjekészletének sokszínűségét, és a sejtben lejátszódó folyamatok dinamikus változását.

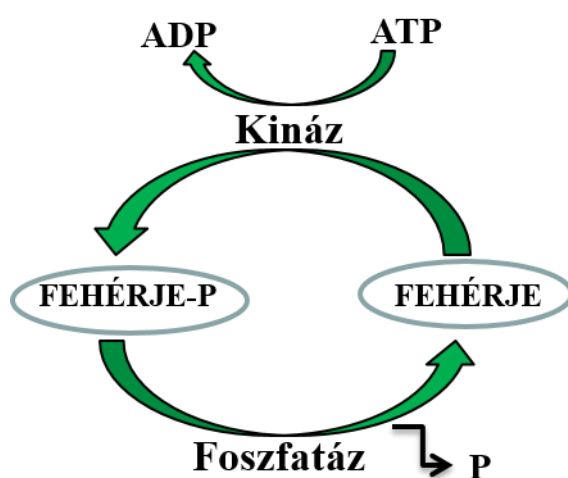


**1. Ábra: A proteom összetettségének okai**

(<http://www.piercenet.com/method/overview-post-translational-modification> alapján)

## 3.2 Foszforiláció, defoszforiláció - kinázok, foszfatázok

A foszforiláció és a defoszforiláció folyamata az egyik legfontosabb reverzibilis poszttranszlációs módosítási mechanizmus, amely egy foszfátcsoport átvitelét jelenti a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncaira az univerzális foszfordonor ATP molekula segítségével (néhány kináz GTP-t használ). A szerin és treonin oldalláncokra kerül a foszforilált fehérjékre átvitt foszfátcsoportok 99%-a, a maradék 1 % jut a tirozin oldalláncokra. A foszforilációt a protein kinázok, míg az ellentétes folyamatot, a foszforilációs folyamatot reverzibilissé tevő defoszforilációt a protein foszfatáz enzimek végzik (Hunter, 1995). A folyamatot sematikusán a 2. ábra mutatja be.



2. Ábra: A fehérjék foszforilációja és defoszforilációja

A kinázok az eukarióta fehérjék kb. egyharmad részét képesek foszforilálni (Davies és mtsai., 2000), de már a prokarióta sejt fehérjéi is foszforilálódhatnak (Cozzone, 1988). A kináz enzimek szerkezetileg hasonlóak, egy közös ősenzimre vezethetők vissza. Számuk a humán proteomban körülbelül 500-ra tehető (Manning és mtsai., 2002). A foszfatázok konvergens fejlődésüknek köszönhetően sokkal különbözőbbek, számuk körülbelül 150 (Cohen, 2004; Jackson és Denu, 2001). A sejtciklus, növekedés, apoptózis és jelátviteli folyamatok széles skálája csak a legfontosabbak azok közül a folyamatok közül, amelyeket a foszforiláció és defoszforiláció szabályozni képes.

A foszforilációs folyamat kétféleképpen fejtheti ki hatását: egyrészt bizonyos fehérjéket, ezáltal bizonyos folyamatokat aktiválni, másokat gátolni képes. Másrészt, a foszforilált fehérjéken lévő foszfátcsoportot más fehérjék konzervált doménjei felismerhetik, ezáltal a fehérje-fehérje kölcsönhatások módosulnak. Például az SH2 domén és a PTB specifikusan



felismerik a foszforilált tirozint (Yaffe, 2002), az MH2 (Wu és mtsai., 2000) és WW (Verdecia és mtsai., 2000) domének a foszfoszerint, a foszfotreonint pedig a FHA domén köti meg (Machida és Yuan, 2013).

Tehát a fehérjék foszforiláltsági állapota, a foszfatáz és kináz enzimek időbeni és térbeni aktivitásának szabályozása és egymáshoz viszonyított aránya a sejtek működése szempontjából alapvető fontosságú. Jó példa erre a glikogén anyagcsere foszforilációval-defoszforilációval finoman szabályozott rendszere: a glikogén lebontásáért felelős foszforiláz enzimet a foszforiláz kináz foszforilációval képes aktiválni, míg a glikogén szintézisét végző szintetáz enzimet a protein foszfatáz 1 defoszforilálja, ezáltal aktiválja.

A következőekben a defoszforilációs módosításokat végrehajtó foszfatázokkal foglalkozunk részletesebben.

### **3.3 A foszfatázok csoportosítása**

A foszforilált szerin és treonin aminosavak illetve a tirozin oldallánc más-más típusú foszfatázoknak lehetnek szubsztrátjai, amelyek eltérő mechanizmussal végzik a defoszforilációt. A szerin/treonin foszfatázok a foszfát csoport közvetlen hidrolízisét katalizálják, míg a tirozin foszfatázok egy tiofoszforil intermedieren keresztül segítik elő a tirozin maradék eltávolítását (Denu és Dixon, 1998). Szubsztrátspecificitásuk és szerkezetük alapján a protein foszfatázokat három nagy osztályba, és több kisebb alcsoportba oszthatjuk (Cohen, 2004; Huang és mtsai., 2006; Farkas és mtsai., 2007, Almo és mtsai., 2007).

#### **I. Szerin/treonin specifikus protein foszfatázok.**

Aktív centrumukban két fémiont tartalmaznak:

- foszfoprotein foszfatázok (PPP): a Zn/Fe tartalmú PP1, PP2A, PP2B; valamint az új típusú protein foszfatázok.
- fémionfüggő protein foszfatázok (PPM): például a  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  függő PP2C.

Aktív centrumukban aszpartát oldallánc található:

- FCP/SCP protein foszfatázok: RNS polimeráz II. C-terminális doménjére specifikusak,  $Mg^{2+}$  függőek.
- HAD (haloacid-dehalogenáz) -szerű foszfatázok: például a cofilin foszfatáz.

## **II. Tirozin specifikus protein foszfatázok.**

Aktív centrumukban cisztein oldallánc található:

- PTP: receptor-, és nem receptor-szerű tirozin-specifikus protein foszfatázok.

## **III. Kettős vagy széles specifitású protein foszfatázok.**

- DSP: Aktív centrumukban cisztein oldallánc található. Képesek a fehérjék szerin, treonin és tirozin oldalláncait is defoszforilálni.

## **3.4 A foszfoprotein foszfatázok**

A foszfoprotein foszfatáz (PPP) családhoz tartozó enzimek már az archaeabaktériumokban is kimutathatók (Kennelly, 2003). Az eukariótákban az enzimes család több tagja is előfordul, így ezeket tekinthetjük a legősibb protein foszfatáz típusoknak. Ezek közül a PP1, PP2A és PP2B tölt be jelentős szerepet, a sejtekben mérhető foszfatáz-aktivitás legnagyobb részét ezek adják (Ingebritsen és Cohen, 1983). A PP1 és a PP2A nem igényel extra fémiont működéséhez, a PP2B kalciumfüggő (Cohen és mtsai., 1990). További tagjai még a csoportnak: a PP4, PP5, PP6, PP7, illetve számos PP1 vagy PP2A szerű foszfatáz, melyeket betű jelöléssel láttak el, pl. PPY vagy PPZ (Cohen, 1997), és amelyeket későbbi felfedezésük miatt új típusú foszfatázoknak nevezünk. Ezek kisebb mennyiségben vannak jelen a sejtekben, ezáltal kisebb aktivitással is rendelkeznek. Azonosításuk a molekuláris biológia eszköztárával, klónozással történt.

A PPP enzimek konvergens fejlődésük következtében sokszínű csoportot alkotnak (Cohen, 2004), általánosan elmondható, hogy holoenzimként - szabályozó és/vagy regulátor alegységekkel összekapcsolódva - töltik be funkciójukat. A sejtek működésében a foszfoprotein foszfatázok alapvető feladatokat látnak el, ezt bizonyítja az a tény is, hogy a

PP1 vagy PP2A foszfatázok aktivitásának drasztikus csökkenése illetve megszűnése letalitást okoz. A PP2B (másnéven kalcineurin) aktivitásának elvesztése nem vezet letalitáshoz, viszont ez a foszfatáz is fontos szabályozó szereppel bír, működése az immunrendszer szempontjából kritikus (Feske és mtsai., 2003).

A PPP csoport tagjainak gyakorlati elkülönítését segítik a gátlószerek (Ingebritsen és Cohen, 1983; MacKintosh és Cohen, 1989). Például a PP1 az inhibitor-1 és -2 fehérjékkel (Huang és Glinsmann, 1976) valamint a tautomycin és tautomycin segítségével gátolható. A PP2A aktivitása okadainsavval (Bialojan és Takai, 1988) csökkenthető.

### **3.5 A protein foszfatáz 1 (PP1)**

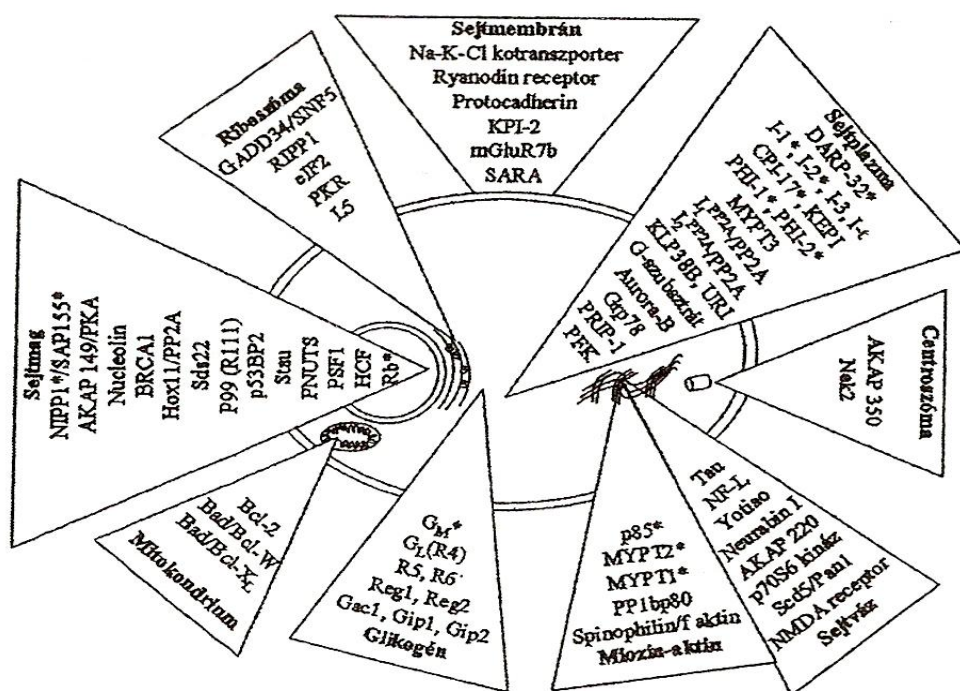
Az életfontosságú PP1 a többi PPP-hez hasonlóan holoenzimként funkcionál: a regulátor alegységek és a katalitikus alegységek összekapcsolódásán keresztül fejt ki hatását.

#### **3.5.1 A protein foszfatáz 1 katalitikus alegységei**

Az első biokémiai vizsgálatok szerint a PP1 katalitikus alegysége (PP1c) körülbelül 35 kDa molekulatömegű, kívülről adott fémiot nem igényel aktivitásához, szerves oldószereknek (etanol kezelés) és proteolízisnek (tripszin) ellenáll, valamint széles szubsztrát specificitással rendelkezik (Silberman és mtsai., 1984). A későbbi molekuláris biológiai vizsgálatok alapján kiderült, hogy emlősökben négy izoformája van, ezek neve a PP1 $\alpha$ , a PP1 $\gamma$ 1, a PP1 $\gamma$ 2 és a PP1 $\delta$  vagy  $\beta$  (Cohen, 1988; Bai és mtsai., 1988; Sasaki és mtsai., 1990). Központi doménjük konzervált. Az N- és C-terminális szakaszok változatosak, a regulációban tölthetnek be fontos szerepet. C-terminális rész proteolitikus lehasadása az enzim aktivitásának fokozódáshoz vezet (Tung és mtsai., 1984), foszforilációja az aktivitás csökkenését okozza (Wang és Brautigan, 2002). Az aktív centrum a fehérje Y-alakú katalitikus árkában van, ahol két fémion helyezkedik el: a Mn<sup>2+</sup> (Egloff és mtsai., 1995) vagy a Zn<sup>2+</sup> (Barford, 1999) és a Fe<sup>2+</sup>. Ezek egy vízmolekulát aktiválnak, így segítve elő a foszfátcsoport hidrolízisét a szerin vagy treonin oldalláncokról. Az okadainsav (Maynes és mtsai., 2001) és kalikulin A (Kita és mtsai., 2002) inhibitorok a katalitikus hely közelében lévő hidrofób árokhoz kötődnek.

### 3.5.2 A protein foszfatáz 1 regulátor alegységei

A PP1 regulátor alegységek szabályozzák az enzim szubsztrát specificitást, a holoenzimet különböző sejt-kompartmentekhez irányítják, valamint kölcsönható fehérjékhez kapcsolódhatnak, amelyek a szabályozás eszközei lehetnek. A PP1c-vel kölcsönható fehérjék az enzim katalitikus zsebbel ellentétes oldalán lévő konzervált hidrofób felülethez kapcsolódnak. Ezt a kapcsolatot a kölcsönható fehérjében található konzervált motívum, az RVxF segíti elő. A 3. ábrán látható a PP1 kölcsönható fehérjék/alegységek sokfélesége (Kókai és mtsai., 2008).



3. ábra: A protein foszfatáz 1 regulátor alegységei lokalizáció szerinti csoportosításban

\* - foszforilálható fehérje. (Forrás: Kókai és mtsai., 2008.)

Ezek a kölcsönható fehérjék keresztül kialakított hálózat teszi lehetővé azt, hogy a PP1 a sejtek életében jelentős és sokrétű szerepet töltsön be (Ceulemans és mtsai., 2002). A PP1 szerepét bizonyították már több alapvető sejt-folyamatban, úgy, mint a transzkripció, transláció, a sejt-ciklus szabályozása, az idegműködés, kontrakció, motilitás, receptorok szabályozása, a reprodukció és a glikogén anyagcsere. Például, az élesztősejtek sejt-magi Sds22 alegység a PP1 mitózisban betöltött szerepéhez járul hozzá (Peggie és mtsai., 2002). A

MYPT/PP1 holoenzim a simaizom relaxációjában játszik szerepet (Hartshorne és mtsai., 1998). A Nek2 fehérjét a PP1-hez kapcsolódva az interfázisos kromoszómák centroszómáiban irták le (Helps és mtsai., 2000). A GADD34 fehérje a PP1 regulátor alegységeként működik az eIF2 $\alpha$  defoszforilálása során (Novoa és mtsai., 2001).

### 3.6 A PP1 szerepe a glikogén anyagcserében

A glikogén foszforiláz és a foszforiláz kináz  $\beta$  alegysége volt a PP1 elsőként azonosított két szubsztrátja (Ingebritsen és Cohen, 1983; Lee és mtsai., 1980). A PP1-ről azóta tudjuk, hogy regulátor alegységeinek segítségével képes kötődni a glikogén partikulumokhoz, és a fenti enzimek defoszforilálásával a glikogén szintézisét segíti elő (Dombrádi és mtsai., 2004).

A protein foszfatáz 1 glikogén metabolizmusban betöltött szerepét igazolja a 3. ábrán bemutatott glikogénkötő kölcsönható partnerek nagy száma is. Az eukariótákban azonosított G (glikogén-kötő) alegységek feladata, hogy a PP1 katalitikus alegységet a glikogénhez kössék. Közös jellemzőjük, hogy két konzervált domént tartalmaznak, az egyikkel a PP1-hez, a másikkal a glikogénhez képesek kapcsolódni. A PP1c glikogénkötő regulátor alegységeivel képzett holoenzimének alapvető szerepe van a glikogén anyagcsere szabályozásában (Toole és Cohen, 2007).

A humán G<sub>M</sub> (PPP1R3) alegység elsősorban a vázizomban és a szívben mutatható ki (Hubbard és Cohen, 1993). PP1/G<sub>M</sub> holoenzim szerepét a glikogén anyagcsere mellett a sejtosztódás, izomösszehúzódás és fehérjeszintézis folyamataiban is leírták. A G<sub>M</sub> alegység a PP1c-t a glikogén partikulumokhoz és a szarkoplazmatikus retikulumhoz horgonyozza, foszforilációja szabályozza a PP1-hez való kötődését és a holoenzim aktivitását (Walker és mtsai., 2000). Többféle humán rákos sejtvonalban is kimutatták, ahol a G<sub>M</sub>, mint lehetséges tumor szuppresszor lehet jelen (Hayashida és mtsai., 2005). A G<sub>M</sub> alegység eltávolítása egerekben a glikogén szintetáz és foszforiláz enzimek hiperfoszforilációjához vezet (Toole és Cohen, 2007). A G<sub>L</sub> (PPP1R3B) alegység elsősorban a májsejtekre jellemző glikogénkötő alegység, de nagy mennyiségben van jelen még a szívben és a vázizomban is. A PP1/G<sub>L</sub> és a PP1/G<sub>M</sub> holoenzimek a glikogén metabolizmusban szerepet játszó glikogén foszforiláz és glikogén szintetáz enzimeket egyaránt defoszforilálják. A G<sub>L</sub> alegységet a 2-es típusú diabetes-szel is összefüggésbe hozták (Dunn és mtsai., 2006). Az R5 (PPP1R3C) alegység a G<sub>L</sub>-hez hasonlóan a máj és izom sejtekre jellemző (Munro és mtsai., 2005). A G<sub>M</sub> alegységgel

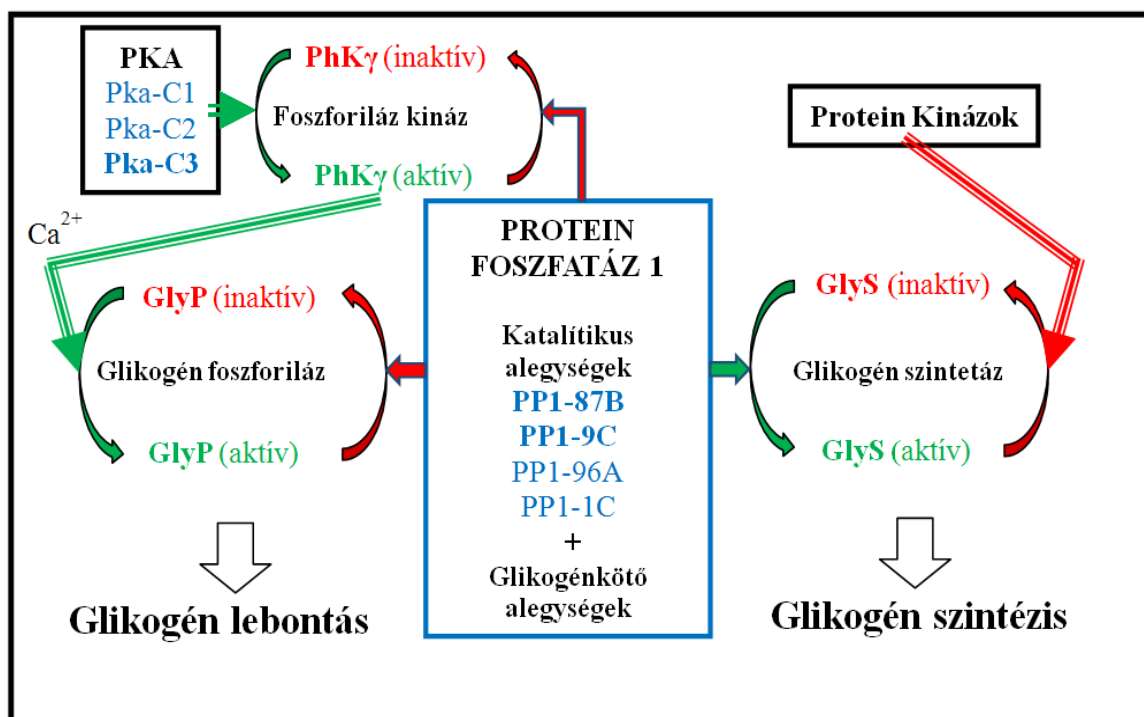
ellentétben a szarkoplazmatikus retikulumhoz nem kötődik, ahogyan az R6 alegység sem, amely az előzőekkel ellentétben széles szövetspecifitással rendelkezik (Montori-Grau és mtsai., 2011).

A Reg1, Reg2, Gac1, Gip1 és Gip2 fehérjék mindegyike a *Saccharomyces cerevisiae* egyetlen PP1géntermékével (Glc7) képesek kölcsönhatni (Cheng és mtsai., 1997; Ramaswamy és mtsai., 1998; Stuart és mtsai., 1994), és a glikogén anyagcsere mellett olyan élettani folyamatokban is szerepet játszanak, mint a meiózis (Tu és mtsai., 1996) vagy a sejtnövekedés (Broach, 2012).

A továbbiakban a *Drosophila* glikogén metabolizmus jellemzőit mutatjuk be, ugyanis a *Drosophila* glikogénkötő alegységeket ezidáig nem jellemezték, és a modellszervezeten a homológ fehérjék vizsgálata a humán modellhez képest egyszerűbb.

### **3.7 A glikogén anyagcsere szabályozása *Drosophila melanogaster*-ben**

A *Drosophila* glikogén anyagcsere foszforilációval és defoszforilációval történő szabályozását a 4. ábra mutatja be az emlősökben leírt mechanizmus alapján. A glikogén szintézisét végző szintetáz (GlyS) több kináz is foszforilálhatja. A foszfátcsoport eltávolítását a PP1 végzi, a szintetáz ebben a defoszforilált állapotban aktív. A glikogén lebontását végző glikogén foszforiláz (GlyP) enzimet a PP1 inaktíválja, foszforilációját a foszforiláz kináz (PhK) végzi. A foszforiláz kináz önmaga is szabályozható foszforilációval: a PKA foszforilálja és aktiválja, a PP1 pedig defoszforilálja és inaktíválja.



**4. Ábra: A protein foszfatáz 1 szerepe a *Drosophila* glikogén anyagcsere szabályozásában**

A domináns izoenzimek nevét vastagon szedtük. (Kerekes és mtsai., 2014 grafikus absztrakt alapján)

A *Drosophila* glikogén metabolizmus enzimeit, a glikogén foszforilázt (GlyP), glikogén szintetázt (GlyS) és foszforiláz kinázt (PhK) korábban biokémiai szempontból már jellemezték (Dombrádi és mtsai., 1985, 1986, 1987a, 1987b). Molekuláris genetikai vizsgálatok tárták fel ezen enzimek jelentőségét. A *Drosophila* GlyP gén csendesítése a repülési képesség romlásában nyilvánul meg, homozigóta KO mutációja letális (Eanes és mtsai., 2006). A PhK deléción az anyai és embrionális expresszió együttes csökkentésekor embrionális letalitást eredményez, ilyenkor a gasztruláció és a mezodermafejlődés sérül. A csak az embriót érintő expresszió csökkentés izomfejlődési rendellenességben nyilvánul meg (Bahri és Chia, 1994). A GlyS RNS interferenciával való csendesítése szintén letalitást eredményez (Dietzl és mtsai., 2007).

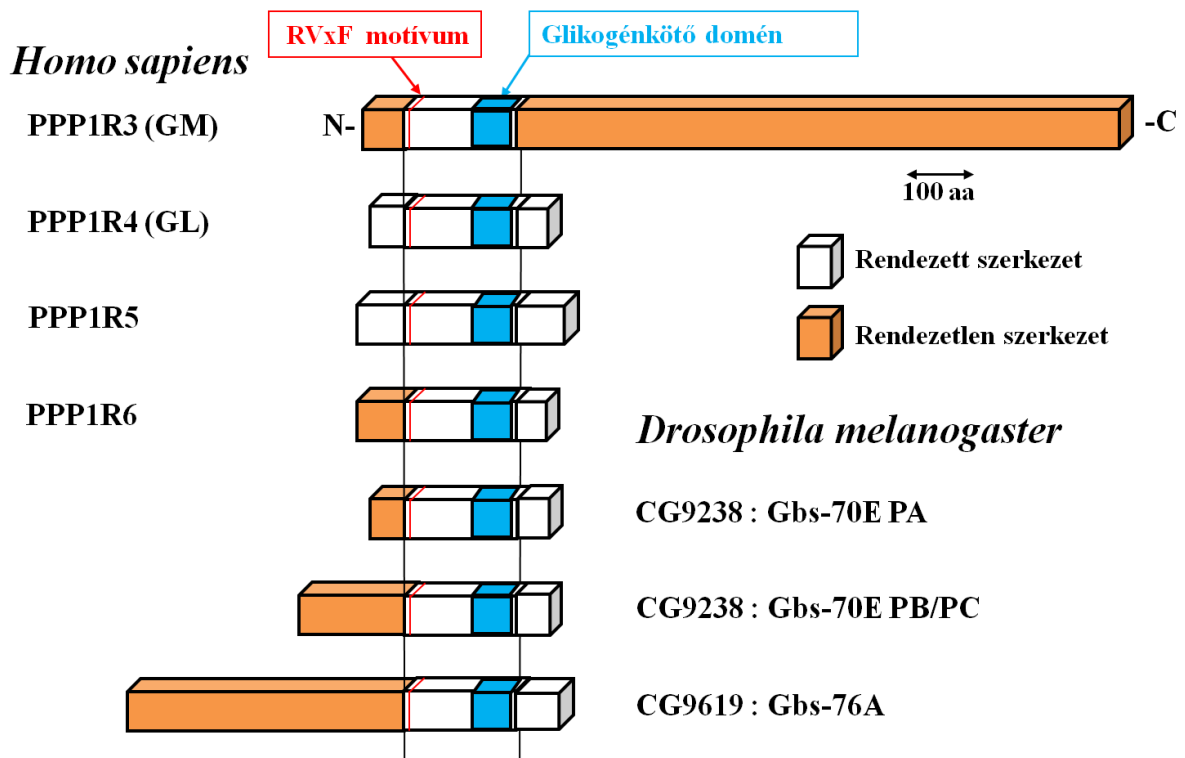
A *Drosophila* glikogén anyagcsere enzimeinek defoszforilálását végző PP1c-nek 4 izoformája létezik, ezek a PP1-87B, a PP1-13C, a PP1-96A és a PP1-9C (Dombrádi és mtsai., 1989, 1990, 1993), amiket a kromoszómális lokalizáció alapján neveztek el. A négy izoforma közül a PP1-87B és a PP1-9C szerepe a legfontosabb. A PP1-9C az emlős PP1δ/β homológjának tekinthető, a többi izoforma pedig a PP1α homológjának. A PP1-87B hiánya az

imágókorong és az idegsejtek fejlődési rendellenességei következtében illetve a sejtciklus zavara miatt lárvastádiumban letalitást eredményez (Axton és mtsai., 1990), emellett ismeretes a gén kromoszómaszerveződésben és mitózisban játszott szerepe is (Dombrádi és mtsai., 1990). A PP1-9C az izomfejlődésben, azon belül is a repüléshez szükséges izmok működésében fontos (Vereshchagina és mtsai., 2004; Deák és mtsai., 1982). A mutáns fenotípusából származik másik elnevezése is: flapwing (*flw*). A PP1-13C kiütése bábállapotban okoz letalitást (Mummery-Widmer és mtsai., 2009), ez az izoforma az idegfejlődési folyamatokban fontos, míg a PP1-96A az immunrendszeri folyamatokban játszhat szerepet (Cronin és mtsai., 2009).

A 4. ábrán látható, hogy a PP1-nek központi, szabályozó szerepe lehet a glikogén anyagcsere enzimeinek regulálásában, a gyümölcslegyekben is. Az egyes izoformák glikogén anyagcserében betöltött szerepét viszont eddig még nem vizsgálták meg. A foszfatáz aktivitásáért leginkább felelős PP1-87B katalitikus alegységet érintő mutánsok többsége ugyanis letális (Axton és mtsai., 1990), ami lehetetlenné tette a PP1c glikogén anyagcserében játszott szerepének közvetlen tanulmányozását.

A foszfatázok szerepének feltárására célszerű megközelítést jelenthet a glikogénköti alegységek tanulmányozása. Azonban eddig még nem jellemezték részletesen a PP1 katalitikus alegységének glikogénköti szabályozó fehérjéit. A *Drosophila* genomban található két gén terméke, a CG9238/Gbs-70E és a CG9619/Gbs-76A (Gbs=glycogen binding subunit) mutat hasonlóságot a humán glikogénköti alegységekkel (Kókai és mtsai., 2001). A CG9238 génről kétféle fehérje képződhet (PA és PB/PC). A Flybase *Drosophila* adatbázis (<http://flybase.org/reports/FBgn0036428.html>) és a már ismert humán glikogénköti alegységek szekvenciáinak összehasonlítása nyomán készült 5. ábra mutatja be a feltételezett *Drosophila* glikogénköti alegységek fehérje szerkezetét, és ezen belül a rendezett és rendezetlen részeket, valamint jóslott PP1c köti motívumát, illetve glikogénköti doménjét.





**5. Ábra: Humán és *Drosophila* glikogénkötő foszfatáz alegységek összehasonlítása**  
(Kerekes és mtsai., 2014 alapján)

A szekvencia hasonlósága mellett ismeretes volt, hogy a Gbs-76A képes a *Drosophila* PP1c minden izoformáját megkötni (Bennett és mtsai., 2006.), míg a Gbs-70E géntermék esetében a PP1-87B és a PP1-96A izoformákkal való kölcsönhatásról számoltak be (Giot és mtsai., 2003). Azonban a glikogénhez való kapcsolódási képességük vagy a glikogén metabolizmusban betöltött szerepük ezidáig nem volt tisztázott.

A *Gbs-70E* gén glikogén anyagcserétől eltérő folyamatokban betöltött szerepéről viszont több irodalmi adat is rendelkezésre állt. Nagy léptékű genetikai szűrések szerint ezek a folyamatok az alkoholtolerancia (Kong és mtsai., 2010), mesterséges tauopátia (Shulman and Feany, 2003; Chen és mtsai., 2007), szaglás alapján bekövetkező elkerülési mechanizmus (Sambandan és mtsai., 2006), és az élethossz meghatározása (Magwire és mtsai., 2010). Globális génexpressziós vizsgálatok alapján az is ismertté vált, hogy a *Gbs-70E* gén expressziója megnő glükóz adásra (Zinke és mtsai., 2002), alkohol hatására (Morozova és mtsai., 2006), és paraquat etetésre (Girardot és mtsai., 2004), de csökken pentiléntetrazol hatására (Mohammad és mtsai., 2009). A gén fiziológiai jelentőségére utal, hogy a *Gbs-70E* *Caenorhabditis elegans* homológjának (*H18N23.2*) inaktiválása embrionális korban letális (Rual és mtsai., 2004). A *Gbs-76A* gén kiütésekor letalitásról vagy egyéb fenotípusos

változásról nem számoltak be. Részletes vizsgálatra a *Gbs-70E* gént és termékét választottuk, mivel az eddig rendelkezésre álló, fent említett irodalmi adatok sokszínűsége arra engedett következtetni, hogy ennek a génnek és géntermékeinek jelentősebb szerepe lehet a *Drosophila* életében.

### **3.8 A fehérjék proteolízise**

A proteolízis az egyik legjelentősebb irreverzibilis poszttranszlációs módosítás, amelyet proteázok végeznek. Több mint 11 ezer proteáz létezik, amelyeknek más-más a sejten belüli lokalizációja, aktivitásának ideje, szubsztrátspecifitása, és a hasítás mechanizmusa. A proteázok által létrehozott proteolízis lehet teljes (degradáció) vagy részleges (limitált proteolízis). A degradáció során a fehérje teljesen elbomlik, ez a jelenség a sejtekben a megfelelő fehérjeszint fenntartására és a szükségtelenné vált vagy rosszul összeszerelt fehérjék eltávolítására szolgál. Ilyen például a lizoszómákban a hidrolázokkal végbemenő bontás. A limitált proteolízis során csak bizonyos helyeken bomlik fel a peptidkötés. Ez a folyamat a sejtekben, mint molekuláris kapcsoló mechanizmus, célfehérjék aktiválásához, funkciójuk elnyeréséhez elengedhetetlen. Például a zimogének aktiválása hasítással, szignálszekvenciák levágása révén valósul meg (Paetzel és mtsai., 2002).

A proteázokat többféle szempont szerint osztályozhatjuk. Ha a fehérjén belüli vágás helyét vesszük figyelembe, endo- és exopeptidázokat különböztethetünk meg. A sejten belüli vagy kívüli lokalizáció szerint lehetnek intra- vagy extracelluláris peptidázok. Az endopeptidázok több mint 90%-át az aktív helyükön lévő csoportok alapján besorolhatjuk az alábbi osztályokba:

- Metalloproteázok: pl. kollagenázok.
- Szerin proteázok: pl. kimotripszin, tripszin.
- Aszpartil proteázok: pl. pepszin.
- Cisztein proteázok: pl. kalpainok, kaszpázok.

#### **3.8.1 A kalpainok**

A kalpainok a papain szupercsaládba tartozó, intracelluláris, kalcium függő cisztein proteázok. Szinte minden élőlényben és szövettípusban megtalálhatók. Neutrális pH-n működnek, kalciumion hatására N-terminális doménjuket autokatalitikusan hasítva

aktiválódnak. A limitált proteolízis során a szubsztrát hasításával annak szerkezetét és aktivitását képesek változtatni (Friedrich és Bozóky, 2005). Specifitásuk nehezen definiálható, szubsztrátjaikat azok térbeli szerkezete alapján ismerik fel. Számos folyamatban fontos szerepük van, ilyen például a sejtek migrációja (Huttenlocher és mtsai., 1997), jelátviteli folyamatok, a sejtciklus szabályozása, mioblasztok sejtfúziója, a sejtek morfogenezise, apoptózis, nekrozis, memória kialakulása, vérerek keresztmetszetének szabályozása (Goll és mtsai., 2003).

A humán genomban 16 kalpain gén található (<http://calpain.org/overview.rb?cls=calpain>). Szerkezetük alapján tipikus és atipikus kalpainok különböztethetők meg. A tipikus kalpainok 4 doménből állnak, míg az atipikus kalpainokban egyes domének hiányozhatnak vagy mással helyettesítődnek. Biokémiai aktivitásuk alapján a legfontosabbak az  $\mu$  (CAPN1) és a m (CAPN2) kalpainok. Az elnevezésük arra a kalcium koncentrációra utal (mikro illetve millimól/liter), amely *in vitro* aktiválásukhoz szükséges. Ezek egy kis (CAPN1, 30 kDa) és egy nagy (CAPN2, 80 kDa) alegységekből álló heterodimereket alkotnak. Specifikus gátlószerük a kalpasztatin (Cast). A kis alegység kiütése KO egerekben embrionális letalitást eredményez (Zimmerman és mtsai., 2000). Letális a CAPN2 nagy alegység kiütése is (Dutt és mtsai., 2006). A CAPN1 nem esszenciális, viszont a vérlemezkék megfelelő működéséhez szükséges (Azam és mtsai., 2001).

A *Drosophila melanogaster*ben négy kalpint kódoló gén van (*CalpA*, *CalpB*, *CalpC* és *CalpD*). Ebben a modell organizmusban sem kis kalpain alegység, sem a gátló hatású kalpasztatin nem fordul elő. A két legfontosabb proteolitikusan aktív enzimforma a *CalpA* és a *CalpB*, melyek a humán m-kalpainokhoz hasonló szekvenciával rendelkeznek (Jékely és Friedrich, 1999). A *CalpB* minden fejlődési stádiumban jelen van. A *CalpA* fehérje a véresejtekre, valamint az idegrendszeri és a középbeli sejtekre jellemző. Proteáz aktivitása csak az A és B enzimformának van. A *CalpC* proteolitikusan inaktív fehérje, a *CalpD* (vagy más néven sol) pedig feltételezhetően transzkripciósfaktorként működik. A négy *Drosophila* kalpain gén expressziójának csökkentése RNS interferencia módszerrel egyik esetben sem okoz letalitást (Mummary-Widmer és mtsai., 2009).

A kalpainok funkciójának vizsgálatára a *Drosophila* modellszervezet az aktív izoformák kis száma miatt alkalmas. Kutatómunkám során bekapcsolódtam a *CalpA* és *CalpB* gének deléciójával előállított nullmutáns törzsek molekuláris biológiai jellemzésébe (Kókai és mtsai., 2012), és az itt szerzett módszertani ismereteket kamatoztattam a *Drosophila* PP1 glikogénkötő alegység funkcionális vizsgálata során.

## 4. Célkitűzések

A *Drosophila* CG9238/Gbs-70E feltételezett glikogénkötő foszfatáz alegység funkcionális vizsgálata céljából a következő kísérleteket terveztük:

- A Gbs-70E fehérje glikogén- és PP1c kötő doménjainak, illetve ezek működőképességének biokémiai vizsgálata, a PP1c izoformákhoz való kötődés esetén a Gbs-70E PP1c aktivitásra kifejtett hatásának megállapítása.
- A *Gbs-70E* gén expressziós mintázatának feltárása a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése során és az egyes imágó testrészekben, illetve az ortológ gének expressziós mintázatának összehasonlítása különböző *Drosophila* fajokban.
- A fehérje szerepének vizsgálatához szükséges mutánsok létrehozása klasszikus genetikai módszerekkel és a génexpresszió csendesítése RNS interferencia módszerrel. A Gbs-70E fehérje funkciójának meghatározása a mutáns és csendesített törzsek fenotípusának analízisével.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Anyagok

#### 5.1.1 *Drosophila* törzsek

Az 1. táblázat tartalmazza a foszfatáz vizsgálathoz használt összes *Drosophila melanogaster* törzset. A *Drosophila* törzsek fenntartását Ashburner (1989) szerint végeztük. A szegedi együttműködő partnereink illetve a mi laboratóriumunk által előállított törzsek létrehozása a következő módon történt:

*del277 és del 81 deléciós mutánsok létrehozása:* A deléciós mutánsokat a P{EPgy2}EY10816 P-elem tartalmú inzerációs törzsből Dr. Páldy Ferencz hozta létre a P-elem transzpozáz enzim segítségével történő imprecíz kivágásával (Bellen és mtsai., 2004). A deléciós mutánsokat első körben genomi DNS izolálás után (Gloor és Engels, 1992) az 5SE40 és 3SE40 primerekkel végzett PCR reakcióval szűrte ki. Az említett primerek a P-elem 2 oldalán helyezkednek el úgy, hogy a PCR reakcióban a vad típusú törzsből egy 1125 bp-os termék keletkezik (az adatokat nem mutatjuk be). A deléciós mutánsok ennél kisebb méretű amplikont eredményeznek, vagy nagyméretű deléció esetén nem szolgáltatnak terméket. A szűrés második körében az Oligo4 és Oligo5 primerekkel végeztünk PCR reakciót. (A PCR reakció leírását részletesen lásd az 5.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek című fejezetben. Az oligonukleotidokra vonatkozó információ a 3. táblázatban található) A PCR termékeket 1% agaróz gélben vizsgáltuk, majd a gélből izoláltuk és szekvenálással azonosítottuk a deléció pontos helyét.

*RNSi törzsek létrehozása:* Az RNS interferenciát az UAS/Gal4 rendszer felhasználásával hoztuk létre muslicákban. Ebben a rendszerben az egyik törzs hordozza a Gal4 kazettát, amely a Gal4 transzkripciós faktort expresszáló genetikai elemet és a hozzá kapcsolt aktív promoter szekvenciát tartalmazza. A másik törzsben az UAS (upstream activating sequence) és a kifejezteni kívánt DNS szekvencia található. Az utódokban a Gal4 kazettán lévő promoter a Gal4 expresszióját beindítja, a létrejövő Gal4 fehérje az UAS régióhoz kötődik, és elindul a mögötte lévő DNS szakasz átírása. RNS interferencia esetében erről a DNS szakaszból olyan kétszálú RNS jön létre, amely a sejtekben feldarabolódik, beépül a RISC komplexbe, processzálódik, majd szekvenspecifikusan a megfelelő mRNS degradációját eredményezi.

**1. Táblázat: A foszfatáz vizsgálathoz felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek**

Rövidítés	Genotípus	Azonosítás	Származás
w1118	w1118 (stock száma: 5905)	kontroll törzsek	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Indiana University, USA
OreR	OregonR (stock száma: 5)		
EP	P{EPgy2}EY10816		
GT1	P{GT1}CG9238[BG02516]	P-elem inzerciós törzsek	
del277	P{EPgy2}EY10816/277	deléciós mutánsok	MTA SZBK, Genetikai Intézet
del81	P{EPgy2}EY10816/81		
i49	w1118; P{GD13796}v24149	RNS interferencia responder törzsek	Vienna <i>Drosophila</i> RNAi Center, Ausztria
i50	w1118; P{GD13796}v24150		
i55	P{KK108355}VIE-260B		
Act	y1 w*; P{Act5C-GAL4}25FO1/CyO, y+	RNS interferencia driver törzsek	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center, Indiana University, USA
Tub	y1 w*; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb		
Act-i24	w1118; P{GD13796}v24149 x Actin5C-Gal4/y+CyO	aktin driverrel indukált RNS interferencia törzsek	saját munka
Act-i50	w1118; P{GD13796}v24150 x Actin5C-Gal4/y+CyO		
Tub-i24	w1118; P{GD13796}v24149 x $\alpha$ Tubulin-Gal4/TM3,Sb	tubulin driverrel indukált RNS interferencia törzsek	
Tub-i50	w1118; P{GD13796}v24150 x $\alpha$ Tubulin-Gal4/TM3,Sb		
Tub-i55	P{KK108355}VIE-260B x $\alpha$ Tubulin-Gal4/TM3,Sb		

Az RNS interferencia törzsek létrehozásához az aktin vagy a tubulin promótert tartalmazó Gal4 általános driver (meghajtó) törzsekből (amiket Dr. Deák Péter biztosított számunkra) szűz nőtényeket gyűjtöttem és a Vienna *Drosophila* RNAi Center-ből beszerzett RNAi „responder” törzsek hímjeivel kereszteztem őket. Ez a két általános driver törzs az utódokban a szervezet minden sejtjében aktiválja az RNS interferenciát létrehozó konstrukciót. A kikelő utódokat a megfelelő marker gének által előidézett fenotípusos jegyek (az aktin driver törzsnél hajlott szárny, a tubulin drivernél rövid hátszörök) alapján különítettem el a Vienna *Drosophila* RNAi Center instrukciói alapján (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>). Az 1.

táblázatból látható, hogy az általunk előállított RNS interferencia törzsek genetikai háttere nem azonos, ami szigorú összevetésüket korlátozza. A 2. táblázat mutatja be a többi *Drosophila* fajt, amelyeket a Gbs-70E ortológok evolúciós vizsgálatához használtunk. Ezeket Dr. Andó István (MTA SZBK) bocsájtotta rendelkezésünkre.

## 2. Táblázat: A Gbs-70E ortológok evolúciós vizsgálatához használt törzsek

Rövidítés	Név	Rendelési szám	Származás
<i>D. vir</i>	<i>Drosophila virilis</i>	15010-1051.87	Indiana <i>Drosophila</i> Species Stock Center, USA
<i>D. will</i>	<i>Drosophila willistoni</i>	14030-0811.24	
<i>D. yak</i>	<i>Drosophila yakuba</i>	14021-0261.01	
<i>D. eug</i>	<i>Drosophila eugacilis</i>	14026-0451.05	
<i>D. bia</i>	<i>Drosophila biarmipes</i>	14023-0361.11	

### 5.1.2 Vegyszerek

A munkám során használt vegyszerek nagyrészt a VWR cégtől szereztük be. A többi vegyszer forrása a következő: desztillált víz (Teva), EDTA (Scharlau), merkaptotanol (AppliChem), BSA, PMSF, szacharóz, akrilamid, izopropil- $\beta$ -D-tio-galaktopiranozid (Sigma), MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> (Reanal), nátrium-dodecil-szulfát, agaróz, Triton-X-100, Tween 20 (BioRad), fenol (Fluka), brómfenol-kék (Spektrum 3D), DTT (Fisher Chemical), dNTP (Promega).

### 5.1.3 Oligonukleotid primerek

A primereket az Oligo Explorer 1.1.0 szoftver segítségével terveztük (<http://oligo-explorer.software.informer.com/>) és az Integrated DNA Technologies cégtől rendeltük. Az általunk használt oligonukleotidok adatait a 3. és 4. táblázat tartalmazza.

## 3. Táblázat: PCR-hez használt primerek

Megnevezés	Szekvencia (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Termék (bp)
5SE40	TCCTCCGATCGGGGCACTT	62	1125
3SE40	GATTTACATATGTCAGGGGAGCAC	63	
Oligo4	ACAAAATAAACAGACCGGAATGCC	62	3387
Oligo5	TGAGATGGCACAGGGCGT	59	
Gbs-70E 5' ATG-NdeI	CCGACATATGGTCAACAACGCCTCGGC	72	997
Gbs-70E 3' NotI	GGGAGCGGCCGCGATTTACCAATATGGCG	77	
Gbs-70E_ATG_SalI	GGCAGTCGACTCATGGTCAACGCCTCG	74	997
Gbs-70E_NotI	GGGAGCGGCCGCGATTTACCAATATGGCG	77	

#### 4. Táblázat: A *Gbs-70E* génexpresszió vizsgálatához használt primerek

Primer név	Faj	Target	Forward primerek (5'- 3')	Tm °C	Termék (bp)
Gbs-70E1-3	<i>D. mel</i>	CG9238	GTTCGTCGTTTTGTGTGTGTGACCAC	67	620, 459
Gbs-70E2-3*	<i>D. mel</i>	CG9238	TCCACCCGTTAGTTTTCTGG	60	175
Gbs-70E3-4*	<i>D. mel</i>	CG9238	GATAGTGACAGCAACGGCG	60	107
Gbs-70E3-6	<i>D. mel</i>	CG9238	TACAATGACGAGCCCAACAGAG	62	994
Gbs-yak1-3	<i>D. yak</i>	GE20018	GTTCGTCGTTTTGTGTGTGTGACCAC	67	589, 468
Gbs-eug1-3	<i>D. eug</i>	AFPQ020 05591	GTTCGTCGTTTTGTGCGTGTGACC	66	603, 457
Gbs-bia1-3	<i>D. bia</i>	AFFD020 07556	GTTCGTGGTTTTGTGCGTGTAAACC	67	661
Gbs-vir1-3	<i>D. vir</i>	GJ11686	CTCGTCGTTTTGTTTTGTGCGGTGCTG	69	692
Gbs-wil1-3	<i>D. wil</i>	GK20414	CCGTCTGCTGTCTTTTCTCTGTG	63	776, 468
RpL23	<i>D. mel</i>	CG3661	GTGATGAACTGTGCCGACAA	58	251
RpL23 Q*	<i>D. mel</i>	CG3661	GAACCTGTACGTGATCGCC	60	169
			<b>Reverz primerek (5'- 3')</b>		
Gbs-70E1-3	<i>D. mel</i>	CG9238	CCATTTCGCTCCAGGTAACCTCCGTC	67	620, 459
Gbs-70E2-3*	<i>D. mel</i>	CG9238	CTGACTGGGACCCTGACC	60	175
Gbs-70E3-4*	<i>D. mel</i>	CG9238	GAGGGTTCGGACATCACAC	60	107
Gbs-70E3-6	<i>D. mel</i>	CG9238	TCAGGGTGGACCTTATTTGCTG	62	994
Gbs-yak1-3	<i>D. yak</i>	GE20018	GACGGAGTTACCTGGAGCGAATGG	67	589, 468
Gbs-eug1-3	<i>D. eug</i>	AFPQ020 05591	CCATACGCTCCAGGTAACCTCCTAC	66	603, 457
Gbs-bia1-3	<i>D. bia</i>	AFFD020 07556	GGCAGGATTTGCGGCTGAGACAG	67	661
Gbs-vir1-3	<i>D. vir</i>	GJ11686	GGCTGAGGCACGATTTGGGCTGTG	69	692
Gbs-wil1-3	<i>D. wil</i>	GK20414	CCTCGGCTCCATTATTCAATCAAC	63	776, 468
Gbs-76A1-2	<i>D. mel</i>	CG9619	ATCATTTCCTGCTTTCCTCTGGTGATC	66	891
RpL23	<i>D. mel</i>	CG3661	CCTTCATTTCCGCCCTTGTTG	58	251
RpL23 Q*	<i>D. mel</i>	CG3661	CCTCCTCCTGAACGGTTTG	60	169

*A\*-gal jelölt primereket Q-PCR-hez használtuk*

#### 5.1.4 Antitestek

A 5. táblázatban feltüntetett antitesteket az ott feltüntetett hígításban használtuk, és a megadott gyártóktól szereztük be a megadott katalóguszám alapján. A dolgozatban az  $\alpha$ -jelölést az antitest rövidítésére használtuk.



## 5. Táblázat: A munkánk során felhasznált kereskedelmi antitestek

Megnevezés	Hígítás	Gyártó	Katalógusszám
$\alpha$ -PP1 $\beta$	1:200	Santa Cruz	sc-6106
$\alpha$ -PP1c	1:1000	Santa Cruz	sc-7482
$\alpha$ -rabbit	1:5000	Sigma	A-0545
$\alpha$ -goat	1:2000	Sigma	A-5420
$\alpha$ -anti-mouse	1:10000	Sigma-Aldrich	A-9044

Az  $\alpha$ -GST (1:2000) antitestet Dr. Farkas Ilona készítette és bocsájtotta rendelkezésünkre. Az  $\alpha$ -Gbs-70E előállítását Dr. Kókai Endrével végeztük az alábbiak szerint: 250 mg tisztított rekombináns 6xHis/Gbs-70E fehérjét (lásd: 5.2.3 fejezet) 50 v/v % Complete Freund Adjuvant (Calbiochem) jelenlétében nyulakba injektáltunk. A második és negyedik hét után megismételtük az injektálást ugyanennyi fehérjével. 10 nappal az utolsó injektálás után a nyulakat kivérettük, az antitestet tartalmazó vérsavót összegyűjtöttük. Kontroll savóként az immunizálás előtt levett vért használtuk. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (*Institutional Ethics Committee*) (7/2010 DE MÁB) engedélyével végeztük. A vérsavó antitesttartalmát 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjét tartalmazó mintával, Dot blot és Western blot kísérletben vizsgáltuk (az eredményeket nem mutatjuk be; Harlow és Lane, 1988).

A Gbs-70E elleni antitest a rekombináns fehérje ellen 1:1000 koncentrációban jól működött, azonban a del81-es deléciós mutáns esetében, amely majdnem nullmutáns törzs, a kontroll törzssel megegyező mennyiségű kb. 40 kDa méretű fehérjét detektált. Ezért azt gondoljuk, hogy az antitest a Gbs-70E fehérje ellen nem teljesen specifikus. Ezt megerősítette a rekombináns 6xHis/Gbs-70E fehérje tömegspektrometriás analízise (MTA SZBK Proteomikai Kutatócsoport), amely az immunizáláshoz használt fehérjemintában bakteriális szennyezést (bakteriális elongációs faktor Tu-Ts komplex) talált, így a vérsavóban a szennyező fehérje ellen is képződhetnek ellenanyagok. Tehát a Gbs-70E antitest nem tekinthető specifikusnak, ezért csak az immunprecipitáció módszernél (lásd: 5.2.4) használtuk, ahol a PP1c-vel való kölcsönhatást vizsgálva feltételeztük, hogy a szennyező fehérje és a PP1c közötti kölcsönhatás valószínűsége elhanyagolható.

### 5.1.5 Táptalajok

- LB tápfolyadék (Luria-Bertani): 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl 1 literhez, pH 7,0. LB agarhoz: ugyanez, 1,5% agarral kiegészítve.
- SOC: 20 g tripton, 2 g élesztő kivonat, 10 mg MgCl<sub>2</sub>, 10 mg MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glükóz, 0,6 g NaCl 1 literhez, pH 7,0.
- Muslica táptalaj: 76 g kukoricaliszt, 41 g élesztő, 72 g cukor, 24 g glükóz, 0,5 g CaCl<sub>2</sub>, 9 g agar-agar, 2 g Nipagin 1 literhez.
- Fekete muslica táptalaj: 4,5 dkg agar-agar 1,5 liter vízben főzéssel feloldva; 500 ml almalé 5 dkg cukorral felforralva; összeöntés után ¼ evőkanál aktív szénnel és 3 g nipaginnal kiegészítve.

### 5.1.6 Oldatok, pufferek

- 10x PBS: 35,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 61,5 g NaCl 1 literre, pH 7,4.
- DNS mintapuffer: 10x TAE puffer, 66,6 % szacharóz, 0,416 % brómfenolkék.
- TAE puffer: 40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA, pH 8,0.
- SDS gél: Alsó gél: 2,5 ml alsó gél puffer (1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8); 3,3 ml 30 % akrilamid és 0,8 % bis-akrilamid tartalmú törzsoldat; 4 ml deszt. víz, 8 µl TEMED, 100 µl 10 % AMPER. Felső gél: 0,38 ml felső gél puffer (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8); 0,5 ml 30 % akrilamid és 0,8 % bis-akrilamid tartalmú törzsoldat; 2,1 ml deszt. víz, 3 µl TEMED, 30 µl 10 % AMPER.
- 10x SDS futtatópuffer: 144,1 g glicin, 30,3 g Tris-HCl, 10 g SDS, desztillált víz.
- 2x SDS mintapuffer: 0,124 M Tris-HC, 20 % glicerol, 4 % SDS, 40 mM DTT, 0,004 % brómfenolkék, pH 6,8.
- Transzfer puffer: 150 ml 5x transzfer puffer (15,5 g Tris-HCl, 72,05 g glicin 1 literhez), 150 ml metanol, 450 ml desztillált víz.

## 5.2 Módszerek

### 5.2.1 Módszertani előzmények

Korábbi munkánk során a *Drosophila* kalpainok funkcionális vizsgálatára kidolgoztunk egy kutatási stratégiát, amit a foszfatáz alegységek tanulmányozásában is felhasználtunk. Korábban, a Dr. Páldy Ferencz (SZBK, MTA, Genetikai Intézet) által létrehozott CalpA transzheterozigóta és CalpB deléciós mutánsok validálására RT-PCR és Western blot kísérleteket végeztünk. Ezekben a kísérletekben az alábbi primereket használtuk (CalpA\_For: ACAATATTGAACAGCTGCCTG, CalpA\_Rev: TTCTGGTGAGCTATC ACTCC; CalpB\_For: TTTATACAGAACGCGCAAGG, CalpB\_Rev: CTTCCAGAACA TGTGGATCC) RT-PCR reakciókban az 5.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek című fejezetben leírtak szerint. A Western blottokat a megfelelő antitestekkel ( $\alpha$ -CalpA (1:2000) illetve  $\alpha$ -CalpB (1:1000)) végeztük az 5.2.4 Immunológiai módszerek című fejezet leírása alapján. Ezeknek az általunk végzett vizsgálatoknak az eredményei (Kókai és mtsai., 2012) Dr. Páldy Ferencz PhD értekezésében kerültek bemutatásra.

### 5.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek

*A nukleinsav izoláláshoz használt minták.* A *Drosophila* w1118 embrió, lárva, báb, hím és nőtény muslica fejlődési állapotokból összegyűjtött mintákat fagyaszott állapotban a MTA SZBK Genetikai Intézetből kaptuk. Az imago testrészek elkülönítése érdekében a nőtényeket CO<sub>2</sub> gázzal altattuk, majd az ovárium és fej eltávolítása után azokat és a test megmaradt részeit PBS-ben mostuk, majd folyékony nitrogénben azonnal fagyasztottuk. A többi esetben a felnőtt legyeket (20-30 db) Eppendorf csőbe összegyűjtöttük, majd ezután CO<sub>2</sub> gázzal altattuk el, és folyékony nitrogénben fagyasztottuk.

*Genomi DNS izolálás.* A genomi DNS kinyerését Ashburner (1989), illetve egy légyből végzett DNS izolálás esetén Gloor és Engels (1992) alapján végeztük.

*Teljes RNS izolálása.* Homogenizáló pálca segítségével TRIzol reagensben (Life Technologies) lizáltuk a mintákat, majd a gyártó ajánlása szerint izoláltuk az RNS-t, amit végül DEPC-es steril vízben oldottunk fel.

*DNáz kezelés.* Az RNS tisztítás során a mintában maradt DNS szennyezést RNase free DNase (Promega) segítségével távolítottuk el a gyártó utasításai szerint.

*Koncentrációmérés.* A DNS és RNS koncentráció meghatározása NanoDrop 1000 UV/Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) segítségével történt.

*Komplementer DNS készítése.* cDNS szintézise RNS templárról M-MLV RT enzim és oligo(dT) felhasználásával (Promega) történt a gyártó utasításai szerint.

*PCR és reverz transzkripció PCR.* A PCR és RT-PCR reakciókat a Recombinant Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Fermentas) felhasználásával végeztük a gyártó utasításai szerint Eppendorf Mastercycler PCR készülékben, majd a PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel 1 % agaróz gélen vizsgáltuk. A géleket GelRed-del (Biotium) festettük és FluorChem FC2 Imaging System készülékkel fotóztuk.

*Kvantitatív PCR.* A Q-PCR reakciót FastStart SYBR Green Master Mix (Roche) felhasználásával végeztük a gyártó instrukciói alapján, Roche LightCycler 480 Instrument készülékben.

*DNS tisztítása agaróz gélből.* A DNS-t 1 % agaróz gélben futtattuk 1 kb DNA Standard (Invitrogen), vagy 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Fermentas) mellett, majd a gélből kivágtuk a megfelelő sávot és a benne lévő DNS-t QIAquick PCR Purification Kit-tel (Qiagen) tisztítottuk a gyártó utasításai szerint.

*Restriktió emésztés.* A klónozással elkészített konstruktokat a plazmid térképnek megfelelő restriktió enzimekkel (Promega) hasítottuk a gyártó utasításai szerint, majd 1 % agaróz gélben futtatva tanulmányoztuk.

*Ligálás.* Az emésztett vektort és PCR terméket T4 ligázzal (Promega) ligáltuk a gyártó utasításai szerint.

*Transzformálás.* Plazmidok, ligálási elegyek *E.coli* BLR vagy DH5 $\alpha$  kompetens sejtbe való juttatásához a transzformálandó elegyet 50  $\mu$ l kompetens sejthez mértük, majd 45 percig jégen tartottuk. Ezután 42°C-on 2 percig hősokkoltuk, majd 2 percig újra jégen tartottuk az elegyeket. Majd 200  $\mu$ l SOC tápfolyadékkal kiegészítve 1 óráig 37°C-on 180 rpm-mel rázattuk, ezután a vektornak megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB agar lemezre szélesztettük, amit egy éjszakán át 37°C-on inkubáltunk.

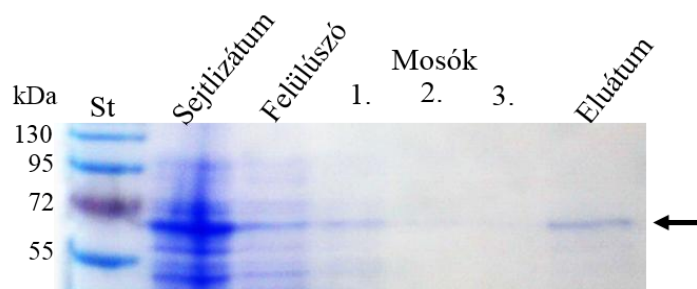
*Plazmid DNS izolálás.* Egy éjszakán át, 37°C-on 200 rpm rázatással inkubált, 5 ml LB + megfelelő antibiotikum táptalajban felnövesztett baktériumtenyészetből preparáltuk a plazmid DNS-t Qiagen Plasmid Mini Kit felhasználásával a gyártó utasításai szerint.

*DNS szekvenálás.* Sanger és mtsai., (1997) szerint történt az UD-Genomed Kft-nél.

### 5.2.3 Fehérje munkák

*Rekombináns fehérje termeltetése:* GST/Gbs-70E fehérje létrehozásához a Gbs-70E legrövidebb transzkriptjének cDNS-ét (RE56341, *Drosophila* Genomics Resource Center, Indiana University, Bloomington) pGEX-5x-1 plazmidba (GE Healthcare) klónoztuk a következő módon. Először a RE56341 cDNS-t Gbs-70E ATG\_SalI és Gbs-70E\_Not I primerekkel amplifikáltuk PCR reakcióban. A PCR terméket agaróz gélben futtatva ellenőriztük és gélből tisztítottuk, ezután a pGEX-5x-1 vektort és a tisztított PCR terméket SalI és NotI enzimekkel (Promega) emésztettük. Az emésztett termékeket agaróz gélben futtattuk és tisztítottuk, majd a cDNS-t a plazmidba ligáltuk. 6xHis/Gbs-70E fehérje létrehozásához a Gbs-70E cDNS-t pET-28a vektorba (Novagen) klónoztuk. Az eljárást a RE56341 cDNS pGEX-5x-1 vektorba való klónozásánál leírtak megfelelően végeztük, azzal a kivétellel, hogy a PCR reakcióhoz használt primerek a Gbs-70E ATG\_NdeI és a Gbs-70E\_NotI voltak. A pET-28a - Gbs-70E konstruktot Dr. Kókai Endre állította elő. A ligálási elegyet *E.coli* DH5 $\alpha$  kompetens sejtbe transzformáltuk. A létrejött telepeket LB és 10  $\mu$ g/ml ampicillin (pGEX-5x-1 esetében) vagy kanamicin (pET-28a esetében) tartalmú tápfolyadékban felnevesztettük, majd ezután plazmidot preparáltunk, amelyet restrikciós analízissel és DNS szekvenálással ellenőriztünk. A kiválasztott konstruktot fehérje expresszió céljából *E.coli* BLR törzsbe transzformáltuk. Az expresszióhoz egy baktérium kolóniát növesztettünk 37°C-on 16 óráig 5 ml LB tápfolyadékban, antibiotikum jelenlétében. Másnap 100 ml antibiotikumot tartalmazó LB tápfolyadékban folytattuk tovább a sejtek növesztését OD<sub>600</sub>=0,6-ig. 0,8 mM (pGEX-5x-1) vagy 0,4 mM (pET-28a) izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk a fehérje expresszióját és ezután még 3,5 óráig 37°C-on inkubáltuk a tenyészeteket, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük.

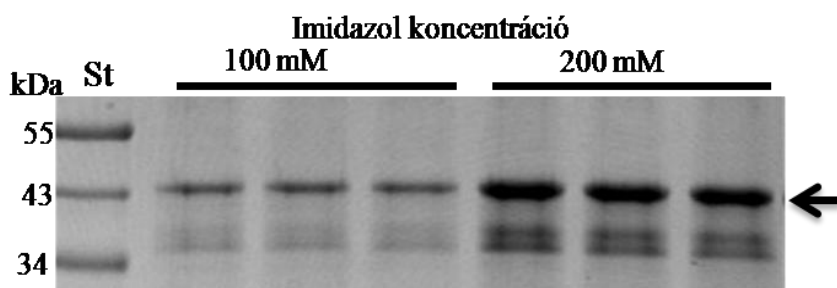
A GST/Gbs-70E esetében MagneGST Protein Purification System (Promega) segítségével tisztítottuk a rekombináns fehérjét a gyártó utasításai szerint. A fehérjemintákat 10 %-os gélen SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (Laemmli, 1970) vizsgáltuk. A minták fehérje tartalmának mérése Bradford (1976) szerint történt, referenciaoldatként BSA-t használtunk. A 6. ábrán a tisztítás lépéseiből készített minták SDS gélelektroforézis képét mutatjuk be. Az eluátum mintában látható a kb. 70 kDa méretű GST/Gbs-70E.



**6. Ábra: GST/Gbs-70E rekombináns fehérje tisztítása**

A pGEX-5X-1 – Gbs-70E konstruktról *E. coli*-ban termeltetett GST/Gbs-70E rekombináns fehérje tisztításának mintái, 10 % SDS poliakrilamid gélen elválasztva. A fehérje tisztítása MageGST kit segítségével történt. St=standard, Page Ruler előfestett standard.

6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérje esetében Ni-NTA Agaróz oszlopon (Qiagen) tisztítottuk a rekombináns fehérjét a gyártó utasításai szerint. Mivel a 6xHis/Gbs-70E fehérje inklúziós testekben van jelen a baktériumsejtekben, ezért 6 M guanidin-HCl-t alkalmaztunk a feltáráshoz. A renaturációt 25 mM Tris-HCl pH 7,2, 250 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 0,4 %  $\beta$ -merkaptoetanol összetételű (Berndt és Cohen, 1990) pufferben végeztük. Az eluáláshoz 100 és 200 mM imidazol koncentrációt használtunk. A további kísérletekben, amelyekhez a 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjét használtunk, a 100 és 200 mM imidazzal eluált mintákat egyaránt felhasználtuk. Az eluátumokat 10 % SDS gélen futtattuk meg. A 7. ábrán látható a 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérje tisztításával kapott eluátumok SDS gélelektorforézissel kapott képe, a kb. 43 kDa méretű 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjével.



**7. Ábra: 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérje tisztítása**

A pET-28a – Gbs-70E konstruktról *E. coli*-ban termeltetett 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérje tisztításának eluátumai láthatók, 10 % SDS poliakrilamid gélen elválasztva. A tisztáshoz Ni-Agaróz gyantát, az eluáláshoz 100 és 200 mM imidazol koncentrációt használtunk. St = Page Ruler előfestett standard.

## 5.2.4 Immunológiai módszerek

*Western blot.* Az SDS mintapufferrel és DTT-vel megfőzött fehérjemintákat 10 %-os SDS poliakrilamid gélen (Laemli, 1970) futtattuk meg PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Fermentas), vagy Spectra Multicolor Broad Range (Thermo Scientific) fehérjelétra mellett, majd nitrocellulóz membránra (Amersham Hybond-ECL) blottoltuk át Bio-Rad elektroforézis és transzfer készülékkel (Harlow és Lane, 1988). A membránok blokkolását 1 órán át TBST-ben (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) oldott 5% tejpor oldatban végeztük, majd az antitesteket is ebben oldottuk be. 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk a membránokat az elsődleges antitestekkel, másnap pedig háromszor 10 percig mostuk TBST-vel. A másodlagos antitesteket szintén a TBST-ben oldott 5%-os tejpor oldatban hígítottuk. Szobahőn 1 óráig rázattuk a membránokat a másodlagos antitest oldatában, majd 2x 10 percig mostuk TBST-vel, majd 10 percig TBS-sel (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). A fehérjéket SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate reagenssel vizualizáltuk Alpha Innotech készülékkel (néhány esetben Agfa röntgenfilmet használtunk az adatok rögzítésére).

*Pull down.* *Drosophila melanogaster* w1118 törzsből származó 60 mg embriót 1 ml lízispufferben (20 mM Tris-HCl pH 6,8; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, 0,01 % merkaptóetanol) homogenizáló pálcával lizáltunk. A lizátumot ezután 3x30 másodpercig szonikáltuk jégen, majd 4°C-on 10 percig 10000 g-vel centrifugáltuk. A pelletet eldobtuk, míg a felülúszót tiszta Eppendorf csőbe vittük át. Eközben 4°C-on 1 órán keresztül inkubáltunk 10 µl 0,4 mg/ml koncentrációjú rekombináns 6xHis/Gbs-70E fehérjét 100 ml lízispufferrel ekvibrált Ni-agaróz gyantával (Qiagen) és 500 ml lízis pufferrel, majd 4 °C-on, 5 percig 10000 g-vel centrifugáltuk. Ezután az így Ni-agaróz gyantára kikötött rekombináns fehérjét 500 µl embrió lizátummal 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd 4°C-on 10 percig 10000 g-vel centrifugáltuk. Negatív kontrollként olyan Ni-agaróz gyantát használtunk, amelyre nem kötöttünk ki rekombináns fehérjét, de a fehérjét tartalmazó gyantához hasonlóan kezeltünk. Az összegyűjtött gyantát háromszor 500 µl lízispufferrel mostuk. A mintákat 2x SDS mintapufferrel és késhegynyi DTT-vel 10 percig főztük, majd Western blottal vizsgáltuk.

*Immunprecipitáció.* 500 ml lízis pufferben (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0,01% β-merkaptóetanol, frissen hozzáadva: 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) homogenizáltunk 100 mg *Drosophila* w1118 törzsből összegyűjtött embriót homogenizáló pálcával, majd centrifugáltuk 4 °C-on 10 percig, 10000 g-vel. A pelletet eldobtuk, míg a felülúszót 100 ml, lízispufferrel ekvibrált Protein-A-agarózon (Sigma)

előtisztítottuk úgy, hogy 4 °C-on 5 óráig forgattuk a mintát. Ezután 4 °C-on 10 perces, 10000 g-s centrifugálással összegyűjtöttük a gyantát. Eközben egy órán keresztül 100 µl 0,9 mg/ml koncentrációjú Gbs-70E antitestet kötöttünk ki lízis pufferrel ekvibrált 50 ml Protein-A-agarózra. Háromszor 500 µl lízispufferrel mostuk a mintát, majd centrifugálással összegyűjtöttük (3 perc, 4 °C, 3000 g). Az előtisztított lizátumot és a gyantát, amelyre Gbs-70E antitestet kötöttünk, egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk forgatással. Másnap a mintát centrifugáltuk 4°C-on 5 percig 10000 g-vel, majd az összegyűjtött gyantát háromszor 500 µl lízispufferrel mostuk. A mintákhoz 50 µl 2x SDS mintapuffert adtunk, késhegynyi DTT-vel 10 percig főztük, majd Western blott módszerrel vizsgáltuk.

### 5.2.5 Biokémiai mérések

*Szedimentációs vizsgálat.* 500 µl 17,6 %-os glikogént (Sigma) inkubáltunk 300 µl 0,65 mg/ml-es GST/Gbs-70E rekombináns fehérjével 1200 µl pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM β-merkaptóetanol, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH 7,5, frissen hozzáadva: 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) 2 órán keresztül 4 °C-on forgatással. Majd 3 ml puffer hozzáadásával az így 5 ml térfogatú mintát egy 10 ml-es centrifugacsőben 5 ml 0,25 M szacharóz oldatra rétegeztük. A mintát Beckman L7-55 centrifugában, 90 percig 100000 g-vel végzett ultracentrifugálással választottuk szét pellet és felülúszó részre. A kísérlethez kontrollként egy másik GST címkével rendelkező fehérjét használtunk, a GST/TIMAP rekombináns fehérjét (Boratkó és mtsai., 2013). A felülúszókból és pelletből vett mintákat 2x SDS mintapufferrel és késhegynyi DTT-vel 10 percig főztük, majd Western blottal vizsgáltuk.

*Foszfataz aktivitásmérés.* Tisztított nyúl vázizom PP1c aktivitását <sup>32</sup>P-foszforiláz vagy <sup>32</sup>P-miozin könnyű lánc szubsztrátokkal Kiss és mtsai. (2012) szerint határoztuk meg, rekombináns GST/Gbs-70E fehérje jelenlétében. Kontrollként rekombináns GST fehérjét használtunk, amit Dr. Farkas Ilona bocsájtott rendelkezésünkre.

*Glikogéntartalom mérése.* A glikogénszint meghatározása fenol-kénsavas méréssel történt Lo és mtsai. (1970) szerint.

### 5.2.6 Biológiai vizsgálatok

*Élesztő kéthibrid kísérlet.* A várható kölcsönhatás a pACT vektor GAL4 aktiváló domén és a pGBKT7 csali vektor GAL4 DNS kötő domén segítségével detektálható. A csali vektor elkészítéséhez pGBKT7 vektorba klónoztuk a Gbs-70E RA cDNS-ét (RE56341). A cDNS klónt Gbs-70E 5' ATG-NdeI és Gbs-70E 3' NotI primerekkel PCR reakcióval amplifikáltuk.



Dr. Dainmark Bennett-től kaptuk meg a 4 darab *Drosophila* PP1C izoforma cDNS-ét tartalmazó pACT vektorban lévő konstruktot (Bennett és Alphey, 2007). A csalivektort a PP1c cDNS-eket tartalmazó konstrukttal kotranszformáltuk páronként PJ-69-4A élesztősejtekbe, majd Gietz és mtsai. (1997) protokollja szerint komplett szintetikus táptalajon (SD) növesztettük őket 15 mM 3-amido-1,2,4-triazol jelenlétében. A kísérlethez negatív kontrollként PPY-pGBKT7 és MYPT-75D-pACT (Vereshchagina és mtsai., 2004) konstrukttal kotranszformáltunk, míg pozitív kontrollként a PPYR1-pGADT7 és PPY-pGBKT7 (Kókai és mtsai., 2006) konstrukttal használtunk. A kotranszformációs élesztőtelepekben a fehérjék kölcsönhatásának kvantitálását galaktozidáz aktivitásméréssel végeztük. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását (Gietz és mtsai., 1997) kolorimetriás méréssel mértük, 5-bromo-4-kloro-indolil  $\beta$ -D galaktopiranozidáz szubsztráttal (Sigma).

*Élethossz meghatározás.* a vizsgált törzseket 25°C-on állandó páratartalom mellett tartottuk fenn, 20 darab *Drosophila*/cső sűrűséggel. Hetente háromszor ráztuk át őket friss táptalajra és a döglött állatok számát feljegyeztük mindaddig, amíg mindegyik el nem pusztult (Hsiu-Yu és Pflieger, 2013). Törzsenként 10-17 csővel végeztük a kísérletet.

*Termékenységi vizsgálat.* fekete táptalajon genotípusonként 2 darab 1-2 napos nőtényt és 2 hím muslicát tartottunk 25°C-on, állandó páratartalom mellett közös csőben, majd 4 nap múlva megszámláltuk a petéket. Törzsenként 8-10 párhuzamos kísérletet végeztünk.

*Életképességi vizsgálat.* kísérletenként 100 darab petét helyeztünk ki általános muslica táptalajra, majd a kikelt felnőtt muslicákat számláltuk meg 6-7 párhuzamos kísérletben.

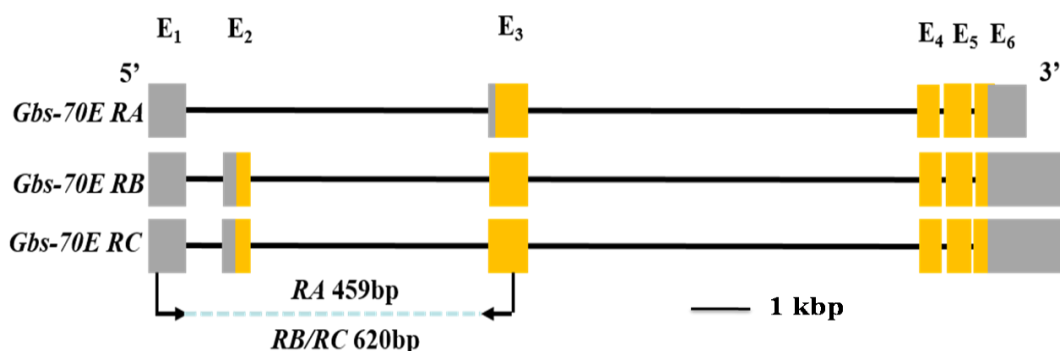
### 5.2.7 Bioinformatikai analízis

A fehérjék szekvenciáját az <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> adatbázisból töltöttük le, és a Clustal W programmal hasonlítottuk össze (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Az RVxF motívumot Ceulemans és Bollen, 2006. alapján emeltük ki, míg a glikogénkötő motívumot <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam03370> alapján azonosítottuk. A rendezett és rendezetlen szerkezetek meghatározásához a <http://anchor.enzim.hu/> programot használtuk. A *Drosophila* Gbs-70E ortológok törzsfáját a Mega5.2 program alapján készítettük. Az alapvető statisztikai vizsgálatok elvégzéséhez (átlag, szórás és középértékszórás számítás) a Microsoft Office Excel programját használtuk. Az ANOVA analízishez (Bonferroni módszer), és a páros T-teszthez a GraphPad Prism 4 szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc.).

## 6. Eredmények

### 6.1 Glikogénkötő foszfatáz alegységek jellemzése

A Flybase internetes *Drosophila* adatbázisból elérhető adatok alapján szekvencia homológia kereséssel azonosítottunk két feltételezett glikogénkötő PP1 alegységet (Kókai és mtsai., 2001). Ezek a Celera Genom kódja *CG9238* és *CG9619*. A *CG9619* gént a géntermék konzervált fehérje szerkezete, foszfatáz kötő képessége és a gén kromoszómális lokalizációja alapján *Gbs-76A* (glycogen binding subunit, a 76A kromoszómális régióban) névvel látták el (Bennett és mtsai., 2006). Hasonló megfontolások alapján a *CG9238*-t *Gbs-70E*-nek neveztük (Kerekes és mtsai., 2014). Az Irodalmi bevezetésben ismertetett megfontolások alapján a *Gbs-70E* alegységet választottuk részletes vizsgálataink tárgyául. A 8. ábrán látható a *Gbs-70E* gén szerkezete és transzkriptumai.



8. Ábra: A *Gbs-70E* gén *RA*, *RB*, és *RC* jelű transzkriptumai

Az E<sub>1</sub>-E<sub>6</sub> exonokat vastag sávok mutatják. A fekete vonal ábrázolja az intronokat. Sárga színűek az mRNS átíródó részei, szürke színűek a nem átíródó részek. Az ábrán láthatóak a *Gbs-70E*<sub>1-3</sub> primerek (4. táblázat) kötőhelyei és a várható PCR termékek mérete is.

A *Gbs-70E Drosophila melanogaster* gén a Flybase internetes *Drosophila* adatbázis (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse2/dmel/?Search=1:name=FBgn0036428>) információi szerint 6 exonból áll, és három mRNS (röviden *RA*, *RB* és *RC*) képződhet a génről. Látható, hogy az *RB* és *RC* transzkriptumok alternatív poliadenilációs szignál használata miatt csak az át nem íródó részekben különböznek (az *RC* transzkriptumban 6-os exon 109 bázispárral hosszabb), így róluk azonos hosszúságú fehérje képződik (PB/PC). Az *RA* transzkript a legrövidebb mRNS, ebből az alternatív splice variánsból a 2-es exon teljes egészében

hiányzik, ezért belőle egy rövidebb, PA jelű fehérje képződhet (lásd 5. ábra). A munkánk elvégzése idején kereskedelmi forgalomban csak az RA mRNS-nek megfelelő cDNS volt hozzáférhető (RE56345, *Drosophila* Genomics Resource Center, Indiana University, Bloomington), így a rekombináns Gbs-70E fehérje létrehozásához ezt használtuk fel. Tehát azok a kísérleteink, amelyekhez rekombináns fehérjét használtunk, a PA izoformával készültek. Ez az izoforma ugyanúgy tartalmazza a konzervált glikogénkötő és foszfatázkötő motívumokat, mint a PB/PC fehérje (5. ábra), így feltételeztük, hogy a PA-val kapott biokémiai adataink a hosszabb izoformára is érvényesek.

## 6.2 A *Drosophila* Gbs-70E biokémiai vizsgálata

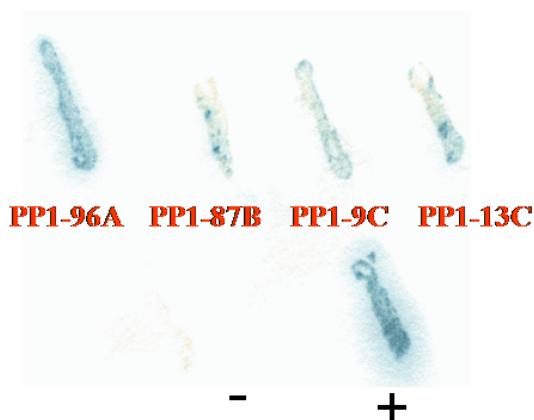
A Gbs-70E feltételezett PP1 glikogénkötő alegység konzervált glikogénkötő és PP1c kötő doménnel rendelkezik (5. ábra). Vizsgálatainkat a konzervált fehérje régiók funkciójának ellenőrzésével kezdtük. Először a Gbs-70E és a *Drosophila* PP1c izoformák közötti kölcsönhatást vizsgáltuk meg több módszerrel.

### 6.2.1 Fehérje kölcsönhatások kimutatása élesztő kéthibrid kísérletekkel

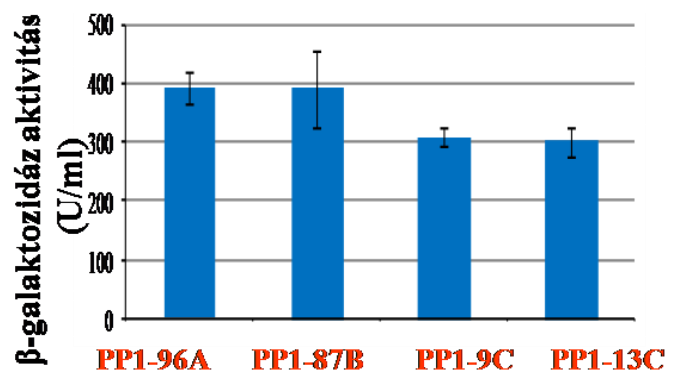
Élesztő kéthibrid kísérletben vizsgáltuk a *Drosophila* PP1 izoformák (PP1-96A, PP1-87B, PP1-9C, PP1-13C) és a Gbs-70E feltételezett glikogénkötő alegység kölcsönhatását. Az említett fehérjéket kódoló cDNS-t tartalmazó plazmidokat páronként kotranszformáltuk *Saccharomyces cerevisiae* sejtekbe. Az élesztő kéthibrid kísérletben a pACT plazmid tartalmazta a foszfatáz katalitikus alegységeket és a hozzájuk kapcsolódó GAL4 aktiváló domént, míg a pGBKT7 plazmid a Gbs-70E PA proteint a GAL4 kötő doménnel. A domének a cDNS-ről átíródó fehérjékkel fúziós fehérjeként expresszázódtak az élesztő sejtekben, és a kérdéses fehérjék kölcsönhatása a GAL4 rendszer elemeit (kötő és aktiváló domén) fizikai közelségbe hozta egymással és közösen aktiválta a kölcsönhatás hiányában egyébként nem aktív *HIS3*, *LacZ*, és *ADE2* riportergének expresszióját. Az élesztő sejtek ekkor képesek voltak növekedni annak ellenére, hogy a szelekciós SD táptalajból hiányzott a hisztidin és adenin is. A felnövekvő sejtek béta-galaktozidáz aktivitással is rendelkeztek, ami az enzim szubsztrátja, a 3-amido-1,2,4-triazol jelenlétében kék-fehér színszelekcióra és kvantitatív meghatározásra adott lehetőséget (Gietz és mtsai., 1997). A 9. ábrán bemutatott élesztő-

kéthibrid kísérletet Dr. Kókai Endre végezte. A foszfatáz izoenzimek cDNS-ét tartalmazó pACT vektorokat Dr. Daimark Bennett-től kaptuk. Kísérletünkben a szelekciós táptalajon való növekedés és a béta-galaktozidáz aktivitás megjelenése egyaránt a PP1 izoformák és a Gbs-70E fehérjék kölcsönhatását mutatják (9. A ábra). Az ellenőrző kísérletekhez pozitív kontrollként PPY-pGBKT7 és PPYR1-pGADT7 kotranszformánst használtunk. A PPY foszfatáz és a PPYR1 fehérje kölcsönhatását korábban már bebizonyítottuk (Kókai és mtsai., 2006). Negatív kontrollként pedig PPY-pGBKT7 és MYPT-75D-pACT kotranszformánst használtunk, amelyek bizonyítottan nem hatnak kölcsön (Vereshchagina és mtsai., 2004).

#### A) Kvalitatív analízis



#### B) Kvantitatív analízis



### 9. Ábra: A Gbs-70E és a PP1c izoformák közötti kölcsönhatás kimutatása élesztő kéthibrid kísérletekkel

A) A kvalitatív analízis során a megfelelő szelekciós táptalajon kék telepek formájában növekednek a Gbs-70E és a *Drosophila* PP1c izoformák cDNS-eit tartalmazó vektorokkal kotranszformált élesztő sejtek, hasonlóan a (+) pozitív kontrollhoz (PPY-pGBKT7 és PPYR1-pGADT7 kotranszformáns), ami a kölcsönhatás meglétére utal. A negatív kontrollban (-) a PPY-pGBKT7 és MYPT-75D-pACT kotranszformáns nem növekedik, mivel a fehérjék között nincs kölcsönhatás.

B) Kvantitatív analízis során a kotranszformáns telepek  $\beta$ -D-galaktozidáz aktivitását mértük meg. Az ábrán hat kísérlet átlaga és szórása látható. (Forrás: Dr. Kókai Endre)

A 9. B ábra mutatja az élesztő kéthibrid kísérlet kvantitatív vizsgálatának eredményeit. Látható, hogy az élesztő kéthibrid kísérletünk kvalitatív és kvantitatív analízise egyaránt a Gbs-70E PA és mind a négy PP1c izoforma közötti kölcsönhatást támasztja alá. Tehát az eddig ismert irodalmi adatokat, amelyek a Gbs-70E PP1-87B és a PP1-96A izoformákkal való interakciót írták le (Giot és mtsai., 2003), eredményünkkel kiegészítve elmondhatjuk, hogy a

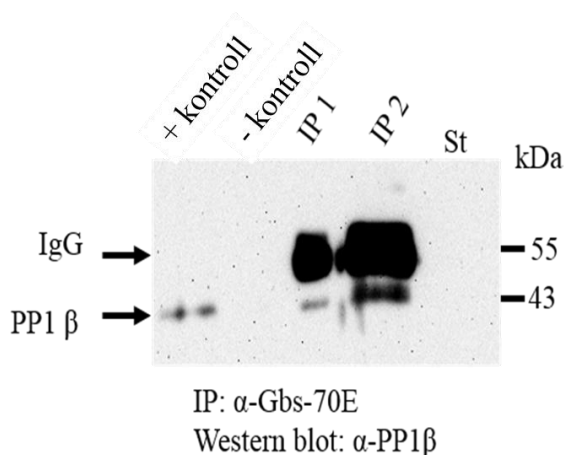
Gbs-70E PA mindegyik ismert PP1c izoformával képes kölcsönhatni. A kölcsönhatás a PP1-87B és a PP1-96A izoformákkal erősebbnek tűnik (9. B ábra), de ez a különbség nem szignifikáns, ezért nem mondhatjuk ki, hogy a kölcsönhatás izoforma specifikus.

### **6.2.2 A PP1c és Gbs-70E közötti kölcsönhatás megerősítése**

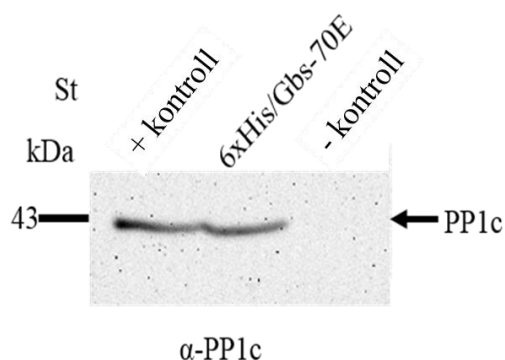
Az élesztő-kéthibrid módszerrel kapott eredményeinket független kísérletekkel, immunprecipitáció és pull down módszerekkel támasztottuk alá. Ezekhez a kísérletekhez rekombináns 6xHis/Gbs-70E PA fehérjét, illetve az ennek felhasználásával készült  $\alpha$ -Gbs-70E antitestet használtuk fel. Ezek előállítását és jellemzését az 5.2.3. és az 5.1.4. fejezetekben írtuk le.

Az immunprecipitáció (10. A ábra) során a Gbs-70E fehérje elleni antitestet kötöttük ki Protein-A-agarózra, majd *Drosophila* embriólizátummal inkubáltuk. Mosás és centrifugálás után az immunkomplexet SDS mintapufferrel való főzéssel választottuk le a gyantáról, és a mintát Western blot kísérletben vizsgáltuk. Pozitív kontrollként immunprecipitálás nélküli teljes *Drosophila* lizátumot használtuk, negatív kontrollként pedig olyan Protein-A-agarózt, amelyre nem volt antitest kikötve. A minták Western blot kísérletben történő vizsgálata során a humán PP1 $\beta$  alegység elleni antitestet alkalmaztuk. Ismeretes, hogy ez az antitest a humán PP1 $\beta$  C-terminális szakaszát ismeri fel. Fehérje szekvencia homológia alapján úgy gondoljuk, hogy az antitest a *Drosophila* PP1-9C-t azonosította, amely a humán PP1 $\delta/\beta$  ortológja. A 10. ábra A részén látható 55 kDa méretű vastag sáv az immunprecipitáció során gyantára kikötött Gbs-70E elleni antitest, a kb. 43 kDa méretű sáv pedig az immunkomplexben detektált PP1-9C. A kísérletet két változatban végeztük, az IP2 minta ötször annyi extrahált *Drosophila* fehérjét tartalmazott, mint az IP1. Mindkét változat igazolta a Gbs-70E fehérje és a foszfatáz katalitikus alegység közötti kapcsolatot.

### A) Immunprecipitáció



### B) „Pull-down” kísérlet



## 10. Ábra: A Gbs-70E és PP1 kölcsönhatás megerősítése

A) *Immunprecipitáció*. Protein-A-agaróz gyantára kötöttük ki az általunk nyúlban termeltetett Gbs-70E antitestet, majd a gyantát *Drosophila* lizátummal inkubáltuk. A mintákat Western blottal vizsgáltuk, a humán PP1 $\beta$  elleni antitesttel, ami valószínűleg a *Drosophila* PP1-9C-t képes felismerni. Negatív kontroll (-): Protein-A-agaróz gyanta Gbs-70E antitest nélkül. Pozitív kontroll (+): *Drosophila* lizátum. Az IP1 és IP2 az SDS mintapufferrel a gyantáról lefőzött immunkomplexet tartalmazza. Az IP2 minta az IP1 fehérje mennyiségének ötszörösét tartalmazza. Az 55 kDa méretű IgG az immunprecipitálás során a gyantára kikötött Gbs-70E elleni antitest, a kb. 43 kDa látszólagos molekulatömegű sáv pedig az immunprecipitáció mintáinak PP1 $\beta$  elleni antitesttel adott sávja.

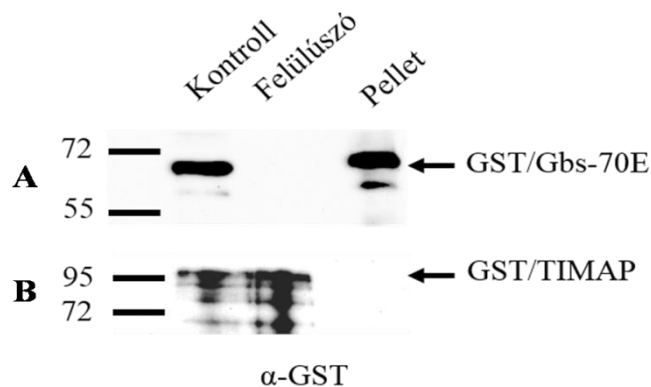
B) *Pull-Down kísérlet*. 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjét Ni-agaróz gyantára kötöttük ki, majd *Drosophila* sejt lizátummal inkubáltuk. Western blot kísérlethez PP1c elleni antitestet használtunk. Negatív kontroll (-): Ni-agaróz gyanta 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérje nélkül. Pozitív kontroll (+): *Drosophila* lizátum. A nyíl a *Drosophila* lizátumból az inkubálás során a 6xHis/Gbs-70E fehérjéhez kikötődött PP1c sávját mutatja.

A pull-down kísérlet (10. B ábra) során 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjét kötöttünk ki Ni-agaróz gyantára, majd a gyantát *Drosophila* lizátummal inkubáltuk. Mosás és centrifugálás után a *Drosophila* lizátumból a rekombináns fehérjéhez kapcsolódott fehérjéket SDS gél elektroforézissel választottuk el. A mintákat Western blot kísérletben vizsgáltuk PP1c elleni antitesttel. A PP1c elleni antitest kísérletes adatok alapján a humán PP1 $\alpha$ -t ismeri fel, amely kísérletünkben szekvenciahomológia alapján valószínűleg a *Drosophila* PP1-96A-t detektálta. Pozitív kontrollként *Drosophila* lizátumot, negatív kontrollként olyan Ni-agaróz gyantát használtunk, amelyre nem volt kikötve fehérje. A nyíl a 10. B ábrán a PP1c-t mutatja a rekombináns fehérjét is tartalmazó mintában. Látható, hogy a PP1c fehérjét csak a rekombináns Gbs-70-t tartalmazó mintából tudtuk kimutatni.

Bár tudjuk azt, hogy az  $\alpha$ -Gbs-70E antitestet nem tekinthető teljesen specifikusnak a Gbs-70E fehérje ellen (lásd: 5.1.4), továbbá a humán foszfatázok ellen termeltetett antitestek közül a PP1 $\beta$  antitest valószínűleg csak a *Drosophila* PP1-9C-t ismeri fel, míg a PP1c elleni antitest a PP1-96A izoenzimet detektálhatta, összességében mégis kimondhatjuk, hogy a 10. ábra alapján bemutatott mindkét független kísérlet alátámasztja a korábban élesztő kéthibrid módszerrel talált Gbs-70E PA és PP1c fehérjék közötti kölcsönhatást. Azaz a korábbi adatokat megerősítve kimondhatjuk, hogy a Gbs-70 a *Drosophila* PP1 alegysége.

### 6.2.3 A Gbs-70E glikogénkötő képességének kimutatása

Miután a Gbs-70E szerkezetében található PP1c kötőmotívum funkciójára tett szerkezeti jóslatot (lásd: 5. ábra) egyértelműen bebizonyítottuk, szedimentációs kísérletben megvizsgáltuk a rekombináns GST/Gbs-70E PA fehérje és a glikogén kölcsönhatását, azaz a Gbs-70E feltételezett glikogénkötő doménjének működését. A GST/Gbs-70E rekombináns fehérjét glikogénnel inkubáltuk, majd megfelelő pufferben szacharóz oldatra rétegeztük és ultracentrifugáltuk az elegyet. A pelletre és felülúszóra szétvált mintákat Western blot kísérletben vizsgáltuk (11. ábra).



### 11. Ábra: A Gbs-70E glikogénkötő képességének igazolása ultracentrifugálással

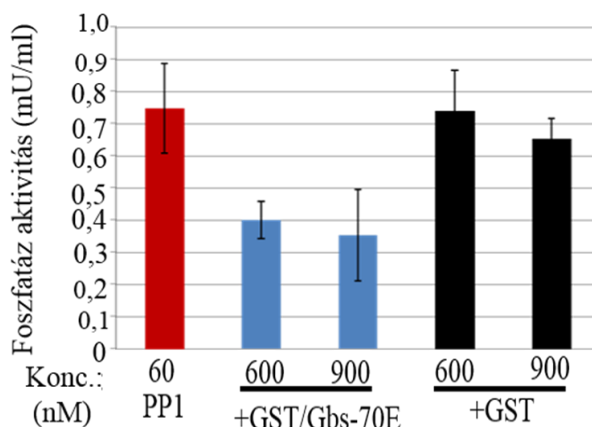
A) A GST/Gbs-70E PA rekombináns fehérjét glikogénnel inkubáltunk, majd szacharózra rétegezve ultracentrifugáltuk. A centrifugálás során pelletre és felülúszóra elkülönülő részeket Western blot kísérletben vizsgáltuk, GST elleni antitesttel. A Kontroll jelölésű minta tisztított GST/Gbs-70E fehérje.

B) A hasonlóan elvégzett negatív kontroll kísérletben rekombináns GST/TIMAP-ot használtunk. A Kontroll jelölésű minta tisztított GST/TIMAP fehérje.

A szedimentációs kísérlet mintáinak Western blottal való vizsgálata szerint a Gbs-70E fehérje a pellet frakcióban mutatható ki a glikogén mellett (11. A ábra). A negatív kontrollként használt rekombináns GST/TIMAP PP1c kötő fehérje (Boratkó és mtsai., 2013), amelynek nem ismert szénhidrátkötő tulajdonsága, a felülúszóban maradt, mivel nem kötődött a vizsgálat során a glikogénhez (11. B ábra). Így igazolni tudtuk a glikogén és a Gbs-70E PA közötti kölcsönhatást, a Gbs-70E konzervált glikogénkötő doménjának működését is. Tehát megállapíthatjuk, hogy a Gbs-70E a PP1 glikogénkötő alegysége *Drosophila*-ban.

#### 6.2.4 A Gbs-70E hatása a protein foszfataz 1 aktivitására

Miután több kísérlettel bizonyítottuk, hogy a PP1c izoformák és a Gbs-70E képes fizikai kölcsönhatásba lépni, megvizsgáltuk, hogy a Gbs-70E fehérjének van-e hatása a PP1c aktivitására. A foszfataz aktivitásméréshez nyúl vázizomból származó PP1c preparátumot, és a glikogén anyagcserében a PP1 szubsztrátjaként szereplő foszforiláz-a szubsztrátot használtunk. Nyúl foszfatazt a különböző élőlényekből izolált PP1c fehérjék aminosav sorrendjének hasonlósága, különösen a katalitikus centrum nagyfokú konzerváltsága miatt alkalmazhattunk. A GST/Gbs-70E PA rekombináns fehérje hatását a PP1c aktivitásra GST kontrollokkal hasonlítottuk össze (12. ábra).

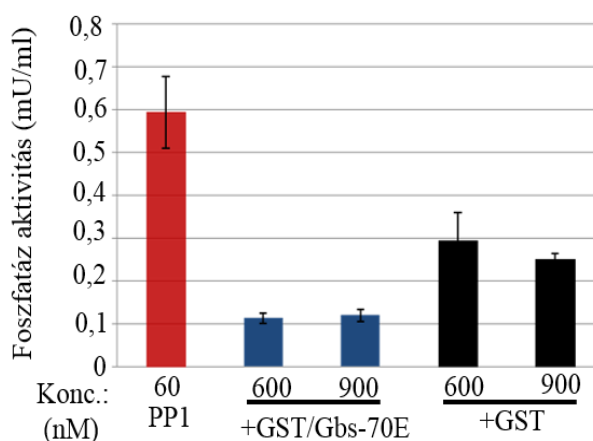


**12. Ábra: A GST/Gbs-70 fehérje hatása a protein foszfataz 1 aktivitásra foszforiláz-a szubsztrát jelenlétében**

60 nM nyúl vázizom protein foszfataz 1 katalitikus alegység aktivitást <sup>32</sup>P-foszforiláz-a szubsztráttal mértük önmagában, vagy 600 és 900 nM rekombináns GST/Gbs-70E fehérje, illetve GST fehérje jelenlétében. Az ábrán 5 mérés átlaga és szórása (SD) látható.



A 12. ábra szerint a rekombináns GST/Gbs-70E PA fehérje koncentrációfüggő módon gátolja a PP1c aktivitást a foszforiláz-a szubsztrát jelenlétében. A Gbs-70E gátló hatása az ANOVA analízis szerint szignifikáns ( $p < 0,001$ ), viszont a GST kontrollhoz képest a szignifikancia nem jelentős ( $p \geq 0,05$ ). Ez a gátló tulajdonság eltér a humán glikogénkötő alegységek tulajdonságaitól, amelyek közül a  $G_M$  és  $G_L$  a PP1-hez kötődve elősegítik a foszforiláz-a defoszforilálását. A PP1c aktivitásának csökkentéséhez a Gbs-70E rekombináns fehérje magas koncentrációjára volt szükség. Ezek alapján felmerült a szubsztrátra irányuló hatás lehetősége, amikor is a regulátor fehérje a foszfatázra gyakorolt hatását a szubsztrát megváltoztatásán keresztül éri el. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk a Gbs-70E fehérje hatását a PP1c aktivitásra miozin könnyű lánc szubsztráttal, amelyről ismert volt, hogy a PP1c szubsztátja, de a glikogén metabolizmusban nem játszik szerepet.



### 13. Ábra: A GST/Gbs-70 fehérje hatása a protein foszfatáz 1 aktivitásra miozin könnyű lánc szubsztrát jelenlétében

60 nM nyúl vázizom protein foszfatáz 1 katalitikus alegység aktivitást  $^{32}\text{P}$ -miozin könnyű lánc szubsztráttal mértük önmagában, vagy 600 és 900 nM rekombináns GST/Gbs-70E fehérje, illetve GST fehérje jelenlétében. Az ábrán 3 mérés átlaga és szórása látható.

A 13. ábrán látható, hogy a PP1c aktivitásának Gbs-70E fehérje hatására történő csökkenése a miozin könnyű lánc szubsztrát esetében is megfigyelhető. A GST/Gbs-70E szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkentette a PP1 aktivitását, viszont a gátlás a GST kontrollokhoz viszonyítva nem volt szignifikáns ( $p > 0,05$ ).

Eredményeink szerint tehát valószínű, hogy a humán homológokkal ellentétben, a Gbs-70E nem befolyásolja a PP1 szubsztrátspecifitását, és az állati eredetű  $G_L$  illetve  $G_M$  alegységekkel ellentétben a Gbs-70E regulátor alegység nem növeli a PP1 aktivitását a

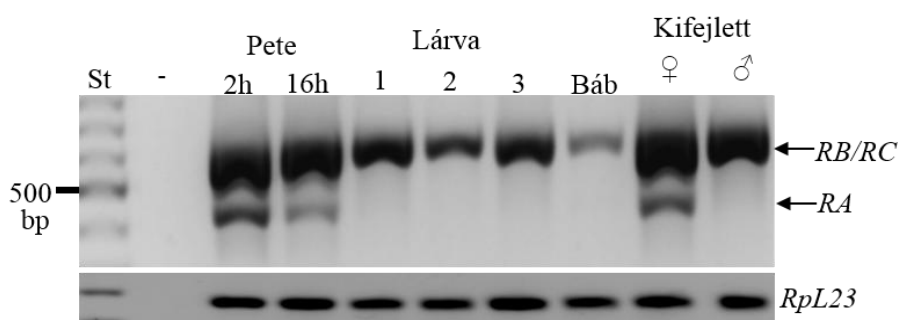
glikogén anyagcsere enzimeivel szemben akkor sem, ha a mérési közeghez glikogént is adtunk.

### 6.3 A *Gbs-70E* gén expressziójának vizsgálata

Miután bizonyítottuk, hogy a *Gbs-70E* a *Drosophila* PP1 glikogénkötő regulátor alegysége, a fehérje fiziológiai szerepének meghatározásához elsőként megvizsgáltuk a gén expresszióját, azaz a génről létrejövő mRNS-ek megjelenését különböző körülmények között.

#### 6.3.1 A *Gbs-70E* gén expressziója a *Drosophila* egyedfejlődése során

A *Gbs-70E* *RB* és *RC* transzkriptumok csak az mRNS 3' végén lévő nem kódoló régiók hosszában térnek el, ezért mindkét formáról azonos fehérje jön létre, tehát ebből a szempontból az *RB/RC* mRNS-ek azonos jelentőségűek. Az *RB* és *RC* transzkriptumhoz képest az *RA*-ból hiányzik a 2-es exon (161 bp). Ezért egy olyan primerpárt terveztünk az expressziós mintázat feltárására, amelynek tagjai az 1-es és a 3-as exonra kapcsolódnak, így a legrövidebb (*RA*) és két hosszabb (*RB*, *RC*) transzkriptumot képesek megkülönböztetni. Ezzel a *Gbs70E1-3* jelölésű primerpárral az RT-PCR reakció során az *RB/RC* mRNS-ek egy 620 bp-os terméket, míg a *RA* egy 459 bp terméket ad (vö. 8. ábra). A *Gbs-70E* expresszióját az egyedfejlődés különböző állapotaiban, a korai (2 órás) és a kései (16 órás) embrió, 1, 2 és 3-as stádiumú lárva, báb, hím és nőstény imágó egyedfejlődési alakokban vizsgáltuk RT-PCR reakcióval (14. ábra).



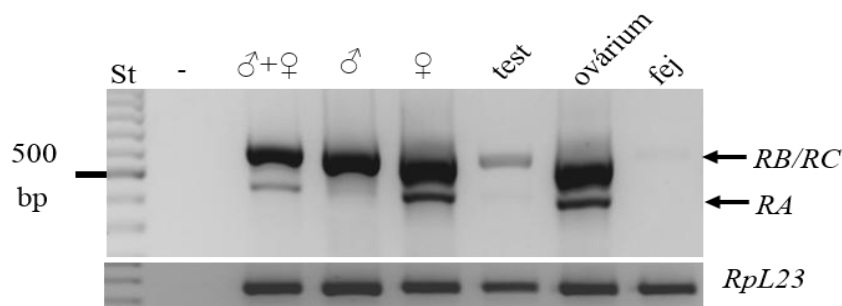
#### 14. Ábra: A *Gbs-70E* gén expressziós mintázata a *Drosophila* egyedfejlődése során

Az RT-PCR reakció a jelzett egyedfejlődési alakokból származó RNS felhasználásával, *Gbs-70E1-3* primerpárral történt. A PCR termékeket 1 % agaróz gélen futtattuk meg. St= Fermentas 100 bp standard. Háztartási gén kontroll: *RpL23*. Negatív kontroll (-): templat nélküli reakció.

A 14. ábrán láthatjuk, hogy a hosszabb *Gbs-70E* transzkriptek (*RB/RC*) minden fejlődési stádiumban kimutathatók, legkevesebb mennyiségben a bábállapotban vannak jelen. A rövidebb *RA* transzkriptet viszont csak a petékben és nőstényekben tudtuk kimutatni. Eredményünk összhangban van a <http://flybase.org/reports/FBgn0036428.html> *Drosophila* internetes adatbázis EST információival, ahol a szekvenciák nagy része (50%) az *RB* és *RC* transzkriptre utal, az *RA* transzkriptet pedig, amely az összes EST kb. 5 %-a, nagyrészt embriókból (70 %) mutatták ki. Mindez az *RA* anyai eredetére utalhat, amely azt jelenti, hogy az embriókban jelen lévő mRNS-ek forrása az anyai szervezet lehet: a petesejt érése során ugyanis az mRNS tartalom nagy része a nőstény szervezetből származik, csak kis hányaduk jön létre az embrióban. Mivel a gyors osztódás miatt a korai embriókban nincs számottevő transzkripció, az anyai eredetű mRNS-ek fontos szerepet játszanak az embriogenezis kezdeti lépéseinek irányításában.

### 6.3.2 A *Gbs-70E* gén expressziója a kifejlett nőstény *Drosophila* testrészeiben

A *Gbs-70E RA* transzkriptumának anyai eredetére utaló eredményünk ellenőrzésére, RT-PCR-rel megvizsgáltuk a transzkriptumok megjelenését a kifejlett nőstények testrészeiben.



**15. Ábra: A *Gbs-70E* expressziós mintázata a nőstények testrészeiben**

RT-PCR reakcióban vizsgáltuk a *Gbs-70E*1-3 primerpárral a kevert imagók, szelektált hímek és nőstények, valamint a nőstények testrészeinek (ovárium, fej, test ovárium és fej nélkül) *Gbs-70E* expresszióját. A PCR termékeket 1% agaróz gélen futtattuk. St: Fermentas 100 bp Standard. Háztartási gén kontroll: *RpL23*. Negatív kontroll (-): templát nélküli reakció.

A 15. ábrán látható eredményünk a szelektált hímek és nőstények esetében megerősíti a *Gbs-70E* szexspecifikus expresszióját: az *RA* mRNS csak a kevert mintákban és nőstényekben van jelen. Az RT-PCR eredménye alapján a nőstényekben döntő többségben az ovárium tartalmazza az *RA* transzkriptet. Az ovárium és fej nélküli test mintában többségben

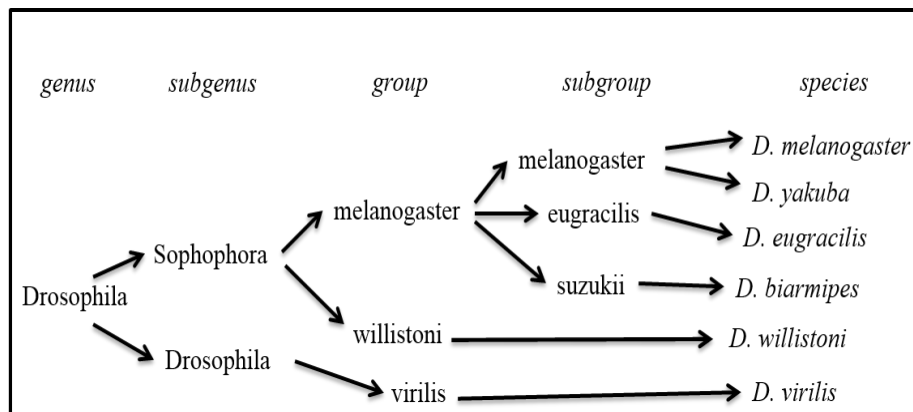
a *RB/RC* transzkriptum mutatható ki. A <http://flybase.org/reports/FBgn0036428.html> *Drosophila* adatbázis RNS szekvenálás és DNS chip adatai alátámasztják eredményeinket, amely szerint a nőstények ováriumában magas a *Gbs-70E* expresszió. A Flybase szerint a fejekben is magas a *Gbs-70E* expressziója, eredményünk szerint azonban itt csak az *RB/RC* transzkriptum mutatható ki meglehetősen alacsony szinten.

Eredményeink alapján a nőstények ováriumában megjelenő *Gbs-70E RA* transzkript és az erről átíródó rövid fehérje izoforma valóban anyai hatásra kerülhet az embriókba. Az expressziós mintázat szerint tehát a rövidebb izoforma az embriogenezisben tölthet be szerepet. A különböző mRNS variánsok eloszlását korábban még nem vizsgálták. Az mRNS szerkesztés szövet és fejlődési állapot függő változásaira nem volt adat. Azt, hogy ez a folyamat valóban jelentős a *Drosophila*-ban, evolúciós vizsgálatokkal kívántuk alátámasztani.

### 6.3.3 A *Gbs-70E* expressziós mintázat evolúciója

A transzkripció mintázat konzerváltsága az egyes fehérje izomák esetében az adott fehérje funkciójának megőrződését jelentheti. Ezért ahhoz, hogy meghatározzuk, hogy a hímekben és nőstényekben eltérően megjelenő *Gbs-70E RA* mRNS embriogenezisben betöltött szerepe konzerválódott-e, megvizsgáltuk a *Gbs-70E* szexspecifikus mintázatát néhány *Drosophila melanogaster*-hez közeli és távolabbi fajban is.

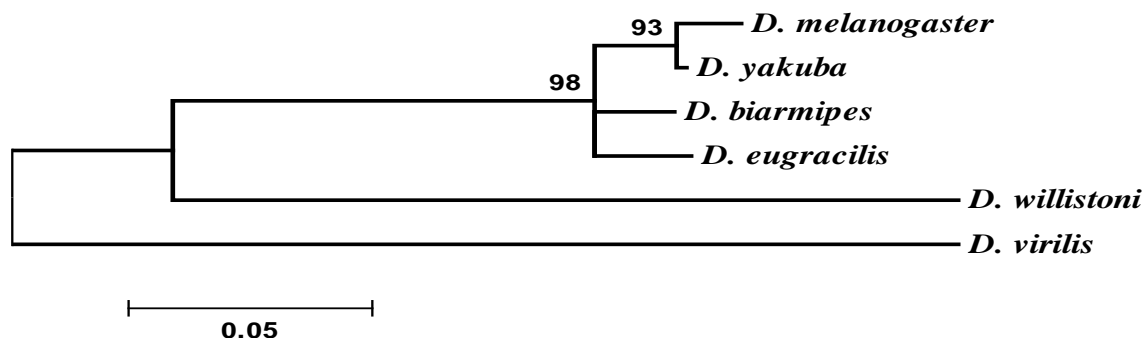
A vizsgálathoz olyan fajokat választottunk, amelyek különböző *Drosophila* csoportokat és alcsoportokat reprezentálnak. A 12 *Drosophila* faj teljes genom szekvenciáját összehasonlító genom projekt (Clark és mtsai., 2007.) eredményei alapján elmondhatjuk, hogy mindegyik vizsgált faj tartalmaz egy *Gbs-70E* ortológot ([http://flybase.org/cgi-bin/quicksearch\\_solr.cgi?caller=quicksearch&tab=basic\\_tab&context=cg9238&data\\_class=FBgn&species=all&search\\_type=all](http://flybase.org/cgi-bin/quicksearch_solr.cgi?caller=quicksearch&tab=basic_tab&context=cg9238&data_class=FBgn&species=all&search_type=all)). Ezek közül a *D. yakuba*, *D. virilis* és *D. willistoni* fajokat választottuk. Az ezeken kívül megvizsgáltuk a kevésbé jellemzett *D. biarmipes* és *D. eugracilis* fajok *Gbs-70E* ortológot kódoló genomi szekvenciáit a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> adatbázis felhasználásával. A vizsgált fajok filogenetikai viszonyait a 16. ábra mutatja be.



**16. Ábra: A vizsgált *Drosophila* fajok és filogenetikai viszonyai**

Az ábra a vizsgált *Drosophila* fajokat és a jelenleg ismert evolúciós viszonyukat mutatja be a [http://flybase.org/maps/chromosomes/synteny\\_table.html](http://flybase.org/maps/chromosomes/synteny_table.html) alapján.

A Gbs-70E fehérje ortológok szekvenciáját a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> oldalról töltöttük le, vagy a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> oldalról nyert genomi szekvenciák alapján a <http://web.expasy.org/translate/> program használatával kaptuk meg. A fehérjékszkekvenciák kiválasztásakor mindig a leghosszabb fehérje izoforma szekvenciáját használtuk, tehát a *D. melanogaster* esetén a PB/PC formát vizsgáltuk. Az elemzés során a Mega5.2 programot (Tamura és mtsai., 2011) használtuk, az aminosav szekvenciák összehasonlításával elkészített törzsfát a 17. ábra mutatja be.



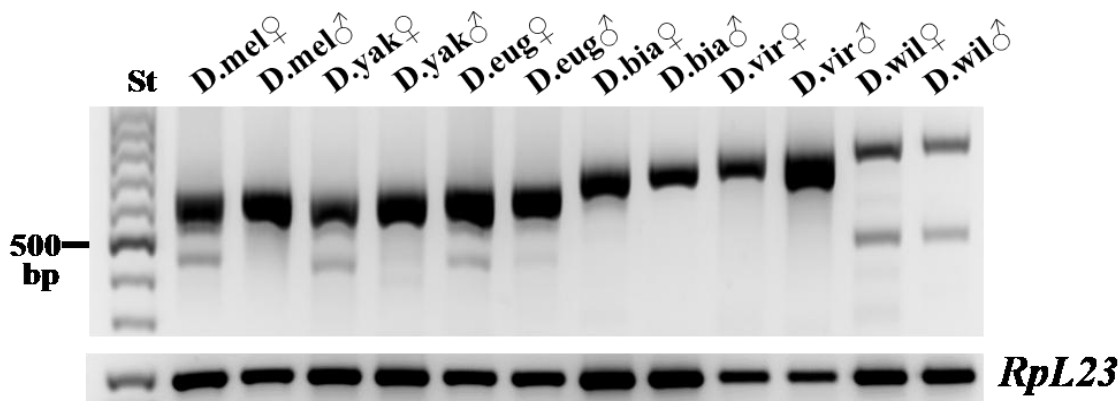
**17. Ábra: *Drosophila* fajok Gbs-70E ortológjainak aminosav szekvencia összehasonlítása**

Az ábrán a Mega 5.2 program, JTT+G módszer („bootstrap” ciklus szám: 500) segítségével készített törzsfá látható. A skála 0,05 aminosavcserét jelöl. A számok a 100-tól eltérő „bootstrap” értékeket mutatják. (Forrás: Dr. Miskei Márton)

Az aminosav szekvenciák összehasonlításával készített törzsfá azt mutatja, hogy a *D. melanogaster* Gbs-70E szekvenciája leginkább a *D. yakuba*, *D. biarmipes* és *D. eugracilis* fajok ortológjaiban konzerválódott, az evolúciós szempontból távolabbi *D. willistoni* és *D.*

*virilis* fajokban Gbs-70E ortológjainak aminosav sorrendje jóval kisebb mértékben őrződött meg. A „bootstrap” értékek alapján a leszármazási viszonyok megbízhatóak. A két törzsfő összehasonlítása alapján megállapíthatjuk, hogy a Gbs-70E ortológ fehérjék evolúciós változása (17. ábra) jól tükrözi a fajok jelenleg ismert evolúciós viszonyait (16. ábra).

Azt, hogy a *Gbs-70E* ortológok expressziós mintázata hogyan alakult a vizsgált fajokban, RT-PCR-rel vizsgáltuk meg (18. ábra). Minden fajra olyan primerpárt használtunk (4. táblázat), amelyek képesek megkülönböztetni a rövidebb transzkriptet a hosszabbaktól.



**18. Ábra: A *Gbs-70E* ortológok vizsgálata különböző *Drosophila* fajokban**

Különböző *Drosophila* fajokból származó hím és nőstény egyedekből nyert RNS felhasználásával RT-PCR reakcióban a gén E1 és E3 exonjain lévő primerpárral vizsgáltuk a hosszabb és rövidebb transzkript megjelenését. A PCR termékeket 1 % agaróz gélen futtattuk. St: Fermentas 100 bp standard. Háztartási kontroll gén: *RpL23*.

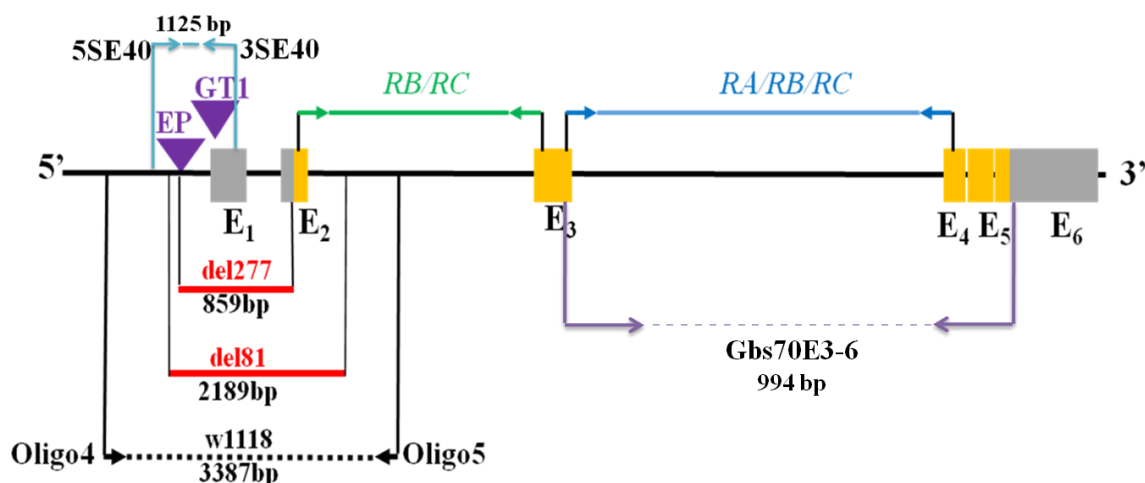
Tekintettel a génszerkezet evolúciós változásaira, csak az egy fajon belüli összehasonlításnak van jelentősége, ezért változik fajonként a PCR termékek mérete (4. táblázat). A 18. ábra alapján elmondhatjuk, hogy a különböző *Drosophila* fajokban a *Gbs-70E* RA transzkriptumának szex specifikus megjelenése nem konzerválódott. A hosszabb transzkriptum(ok) minden fajban kimutathatók. A *Drosophila melanogaster*-hez evolúciósan közeli *D. yakuba* és *D. eugracilis* fajokban hasonló szexspecifikus mintázat található, a nőstényekben kimutatható a rövidebb transzkript is. Viszont a szintén melanogaster alcsoportba tartozó *D. biarmipes* nősténye már nem tartalmaz RA-t, ahogy a *Drosophila* subgenust reprezentáló *D. virilis* nőstény egyedei sem. A Sophophora alcsoportba tartozó, de a *D. melanogaster*-hez képest nagy evolúciós távolságra lévő *D. willistoni* fajban viszont a rövid transzkript a hímekben is kimutatható. Tehát úgy tűnik, hogy a *Gbs-70E* RA anyai

eredetű specifikus szerkesztése nem létfontosságú, mivel a gén szexspecifikus expressziós mintázata nem konzerválódott.

## 6.4 A *Gbs-70E* funkciójának meghatározása genetikai vizsgálatokkal

### 6.4.1 *Gbs-70E* deléciós mutánsok létrehozása

A *Gbs-70E* pontosabb funkcióját a gén expressziójának csökkentésével és az alacsonyabb expresszió okozta fenotípus vizsgálatával határoztuk meg. Ehhez először a *Gbs-70E* gént molekuláris genetikai módszerekkel deletáltuk. A 19. ábrán látható a *Gbs-70E* gén szerkezete az *RC* transzkripttel, és a vizsgálatokhoz használt inzerciós, és deléciós mutánsok sémája.

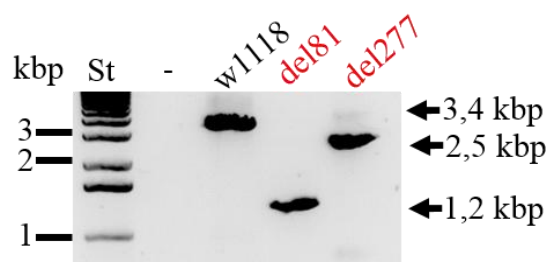


19. Ábra: A *Gbs-70E* gén, illetve a *Gbs-70E RC* transzkript szerkezete

Az inzerciós mutánsok P-elemeinek neve és helyzete (lila), a létrehozott deléciós mutánsok neve (piros), deléciójának mérete, valamint a deléciós mutánsok ellenőrzéséhez használt primerpárok (5SE40 és 3SE40; Oligo 4 és 5) láthatók a sémán. A *RB/RC* illetve *RA/RB/RC* feliratú zöld és kék nyilak és vonalak az expressziós szint meghatározásához szükséges kvantitatív RT-PCR primerek helyzetét illetve az RT-PCR termékek méretét mutatják. A *Gbs-70E3-6* primerpárral a törzsek kvalitatív RT-PCR vizsgálatát végeztük (lásd: Függelék).

A del277 és del81 deléciós törzseket Dr. Páldy Ferenc Dr. Gausz János irányítása alatt az EP inzerciós törzsből hozta létre, a P-elem transzpozáz enzimmal történő mobilizálásával. Ismeretes, hogy a P-elem mobilizálása során ritkán kisebb-nagyobb méretű genomi szakasz is

távozhat a P-elem eredeti inzerciós helyéről. A lehetséges deléciókat első körben az 5SE40 és 3SE40 elnevezésű primerpárral (3. táblázat) PCR reakcióval azonosítottuk (az eredményt nem mutatjuk be). A vad típusú kontroll törzsben ezzel a primerpárral 1125 bp amplikont kaptunk. A deléciós törzsek első ellenőrzését az 5SE40-3SE40 primerpárral Dr. Páldy Ferencz végezte. Ebben a szűrésben a kisméretű deléciók a kontrollhoz képest kisebb méretű terméket adnak, azonban a P-elem sikertelen eltávolítása vagy nagyobb méretű deléció esetén a PCR nem eredményez terméket. Mivel a célunk a lehető legnagyobb deléció felkutatása volt, ezért második körben a PCR terméket nem adó genomi DNS mintákat az Oligo4 és Oligo5 primerpárral (3. táblázat) PCR reakcióban vizsgáltuk. A deléciós mutánsokból nyert genomi DNS-sel végzett második PCR szűrés eredményét a 20. ábra mutatja. A várakozásnak megfelelően (lásd. 19. ábra) az Oligo 4 és 5 primerpárok egy kb. 3,4 kbp szakaszt amplifikálnak a kontroll w1118 törzsben. A del277-es deléciós mutánsból származó genomi DNS templáttal a PCR reakció egy 2,5 kbp szakaszt eredményez, a del81-es törzsből származó genomi DNS pedig 1,2 kbp-os terméket.



## 20. Ábra: *Gbs-70E* deléciós mutánsok azonosítása PCR reakcióval

A PCR reakciót genomi DNS templáttal, Oligo4 és 5 primerpárral és Long PCR enzimmal (Fermentas) végeztük. Futtatás: 1% agaróz gélen. St= Invitrogen 1 kb standard. Negatív kontroll: templát nélküli reakció. A nyilak a w1118, a del277 és a del81 törzsből származó genomi DNS templátból amplifikált szakaszokat mutatják, amelyek sorban 3,4 kbp, 2,5 kbp és 1,2 kbp méretűek.

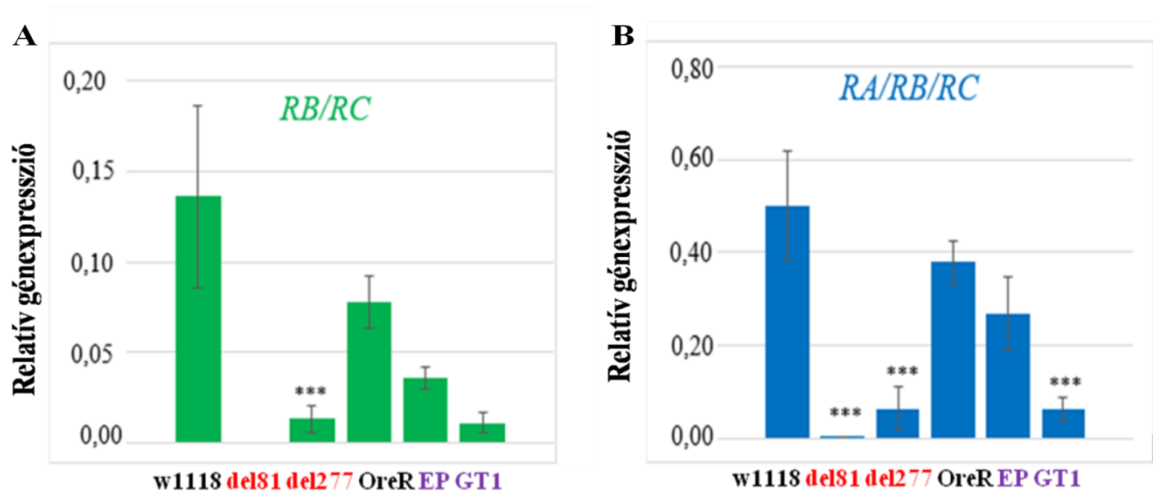
Tehát a deléciók mérete a PCR szerint a del277-es törzs esetében 0,9 kbp, a del81 deléciós mutáns esetében 2,2 kbp. A pontatlan kivágódással eltávolított genomi szakasz deléciós töréspontjait szekvenálással határoztuk meg, ami a del277 jelölésű törzs esetében 859 bp, a del81 esetében 2189 bp. Így a 20. ábrán bemutatott PCR reakciók eredménye összhangban van a szekvenálás eredményével. A 19. ábrán az is látható, hogy 5SE40 és 3SE40 primerek kötőhelye az 1-es exonban és az 1-es exon előtti részén helyezkedik el, így a



nagyméretű deléció miatt a két deléciós mutáns törzsben a primerek kötőhelye megszűnt. Tehát eredményünk összhangban van az elsődleges szűrés negatív PCR eredményeivel is.

A deléciós mutánsokban a *Gbs-70E* gén eltérő nagyságú szakaszai hiányoznak. A del277 deléciója a promoter régiót érintheti, azonban a rövidebb és a hosszabb transzkriptek kódoló része is érintetlen. A del81-es törzs deléciója nagyobb, a 2-es exon hiánya miatt a hosszabb mRNS-ek teljesen hiányozhatnak. A P-elem tartalmú törzsekben a P-elemek is módosíthatják az expressziót, ugyanis az általunk vizsgált elemek a promóterben illetve az első exonban találhatóak. Ezért a következő lépésben a funkcionális vizsgálatokhoz használt kontroll törzsek (w1118, OreR), az inzerciós törzsek (EP, GT) és a deléciós mutáns törzsek (del277 és del81) relatív *Gbs-70E* gén expresszióját kvalitatív és kvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk.

A kvalitatív PCR során a *Gbs-70E3-6* primerekkel (4. táblázat) vizsgáltuk a törzsek *Gbs-70E* expresszióját *RpL23* háztartási gén kontroll mellett. A primerek bekötődési helyei a 19. ábrán látható módon a 3. és a 6. exonon vannak, így a primerpár mindhárom transzkriptumot képes felismerni, róluk a RT-PCR reakció során 994 bp termék jön létre (lásd Függelék). A kvalitatív PCR kísérlet eredménye alapján a P-elem inzerciók és a del277 deléció kismértékben csökkentik az *Gbs-70E* expresszióját, míg a del81 deléciós mutáns törzsben a gén expressziója jelentős mértékben csökken. Az eredmények pontosítása érdekében a génextpressziót kvantitatív RT-PCR segítségével is meghatároztuk (21. ábra). A relatív expresszió kvantitatív vizsgálatához a 19. ábrán látható módon két primerpárt használtunk. A *Gbs-70E2-3* jelű primerpár csak a két hosszabb mRNS-t (*RB/RC*), a *Gbs-70E3-4* jelű pedig mindhárom mRNS-t (*RA/RB/RC*) képes volt felismerni. A törzsek eltérő genetikai háttere miatt a deléciós törzsek kontrollja a w1118 törzs, míg az inzerciós törzsek kontrollja az OreR törzs volt (lásd 1. táblázat). A 21. ábrán látható, hogy mindkét primerpárral végzett kvantitatív RT-PCR kísérletben a del81 törzs expressziója a legalacsonyabb. Ez részben abból adódik, hogy a del81-es törzsben a *Gbs-70E* expressziója nem detektálható a *Gbs-70E2-3* primerpárral, mivel ebből a deléciós törzsből hiányzik a 2-es exon, tehát nincs meg az egyik primer bekötődési helye. Azonban a *Gbs-70E3-4* primerpárral kapott eredmény döntő jelentőségű, az expresszió csökkenése szignifikáns. Feltételezhetjük, hogy a del81-es törzs esetében a hiányzó genomi szakasz miatt csak a *Gbs-70E RA* mRNS keletkezhet, esetleg a hosszabb *RB/RC* mRNS-ek trunkált formája.



**21.Ábra: Kontroll (w1118, OreR), inzerciós mutáns (EP, GT1) és deléciós mutáns (del81, del277) törzsek relatív *Gbs-70E* expressziójának vizsgálata kvantitatív RT-PCR reakcióban**

A) Az *RB/RC* transzkript detektálására alkalmas *Gbs-70E2-3* primerpárral (a del81 mutánsban található nagyméretű deléció miatt ez a primerpár nem alkalmas az *RB/RC* transzkript kimutatására ebben a törzsben).

B) Mindhárom mRNS detektálására alkalmas *Gbs-70E3-4* primerpárral.

A relatív génextpressziót a *RpL23* háztartási gén kontrollhoz viszonyítva adtuk meg. Az ábrán három független mérés átlagai és szórásai láthatók. A szignifikanciát ANOVA analízissel számítottuk, \*\*\*  $p > 0,001$ .

A kvantitatív RT-PCR során a többi törzs expressziója is csökkent mértékű volt: a GT1 törzs a *Gbs-70E3-4* primer esetén, a del277 törzs pedig mindkét primerpár esetén szignifikánsan ( $p > 0,001$ ) csökkent *Gbs-70E* expressziót mutatott. Tehát a kvantitatív RT-PCR eredménye összhangban van a kvalitatív RT-PCR során kapott eredménnyel, és arra utal, hogy a funkcionális vizsgálatok elvégzésére legalkalmasabb a del81 mutáns.

#### 6.4.2 A *Gbs-70E* funkcionális vizsgálata

Mivel az összes általunk vizsgált mutáns, beleértve a legnagyobb deléciót hordozó null-mutánsnak tekinthető del81-et is, életképes, megállapíthatjuk, hogy a *Gbs-70E* fehérje hiánya egy bizonyos szintig kompenzálódik, és funkciója nem létfontosságú. A *Gbs-70E* fehérje funkcionális vizsgálata során irodalmi adatokra alapozva megmértük a törzsek életképességét és megvizsgáltuk, hogy a glikogénkötő alegység expressziójának csökkenése hatással van-e a gyümölcslegyek glikogéntartalmára. A törzsek életidejének meghatározását és a raktározott glikogénszint mérését is felnőtt muslicákból végeztük. A 6. táblázatban

látható, hogy a legkisebb *Gbs-70E* génexpressziós szintet mutató del81 deléciós mutáns jelentősen rövidebb ideig él és jóval kevesebb glikogént tartalmaz, mint a többi törzs. A többi törzs esetében a csökkent expressziós szint nem járt jól detektálható szignifikáns fenotípusos változással.

**6. Táblázat: A *Gbs-70E* hatása az élethosszra és a glikogéntartalomra**

Törzs	Élethossz		Glikogéntartalom	
	Napok	±SEM (n)	(mg/mg)	±SD (n)
<b>OreR</b>	45,4	±0,9 (368)	1,007	±0,06 (5)
<b>EP</b>	39,7	±1,5 (253)	1,176	±0,16 (5)
<b>GT1</b>	48,6	±0,9 (279)	0,91	±0,07 (5)
<b>w1118</b>	42,1	±1,4 (334)	1,086	±0,08 (9)
<b>del277</b>	44,8	±1,3 (204)	1,184	±0,23 (5)
<b>del81</b>	<b>31,9 ***</b>	<b>±0,9 (281)</b>	<b>0,496***</b>	<b>±0,09 (10)</b>

SEM=középértékszórás, SD=szórás, n=darabszám. A glikogéntartalom feltüntetett értékei egységnyi fehérjemennyiségre (1 mg) értendőek. A szignifikanciát ANOVA analízissel számítottuk, \*\*\*  $p > 0,001$ .

A 6. táblázat adatai azt mutatják, hogy az expressziós szint enyhébb csökkentése fenotípusos jegyekben nem nyilvánul meg, viszont a gén termék majdnem teljes hiánya jelentősen csökkenti a raktározott glikogén mennyiségét és a *Drosophila* élethosszát. A 21. ábra alapján feltételezhető, hogy az EP, GT1 és a del277 törzsekben kisebb mennyiségű, de teljes hosszúságú mRNS-ek keletkezhetnek, amelyekről átíródó fehérje elegendő ahhoz, hogy a kontrollhoz képest jelentősebb fenotípusos változás ne jöjjön létre. Ezzel szemben a del81 deléció mérete nem teszi lehetővé a funkcióképes *RB* és *RC* transzkriptumok létrejöttét.

Mivel a *Gbs-70E RA* mRNS expressziós mintázata anyai hatásra utalt és a del81-es mutáns törzs *Gbs-70E* deléciója jelentős mértékben csökkentette az élethosszt, megmértük a w1118 és a del81 törzsek nőstényeinek termékenységet, illetve a törzsek által lerakott peték életképességét is. A termékenységi vizsgálat során a nőstényenként 4 nap alatt átlagosan lerakott peték számát vizsgáltuk, a peték életképességének vizsgálata során a 100 darab petéből átlagosan kikelt muslicák számát határoztuk meg. Eredményeinket a 7. táblázat tartalmazza.

## 7. Táblázat: A Gbs-70E hatása a termékenységre és a peték életképességére

Törzs	Átlagosan lerakott peték száma		Átlagosan kikelt muslica/100 db pete	
	darab	SD (+/-)	darab	SD (+/-)
w1118	212,6	35,4 (n=10)	56,5	18,3 (n=6)
del81	<b>69,4 ***</b>	<b>9,5 (n=8)</b>	48,9	15,4 (n=7)

SD=szórás, n=darabszám. A szignifikanciát t-tesztel számítottuk, \*\*\* p>0,001.

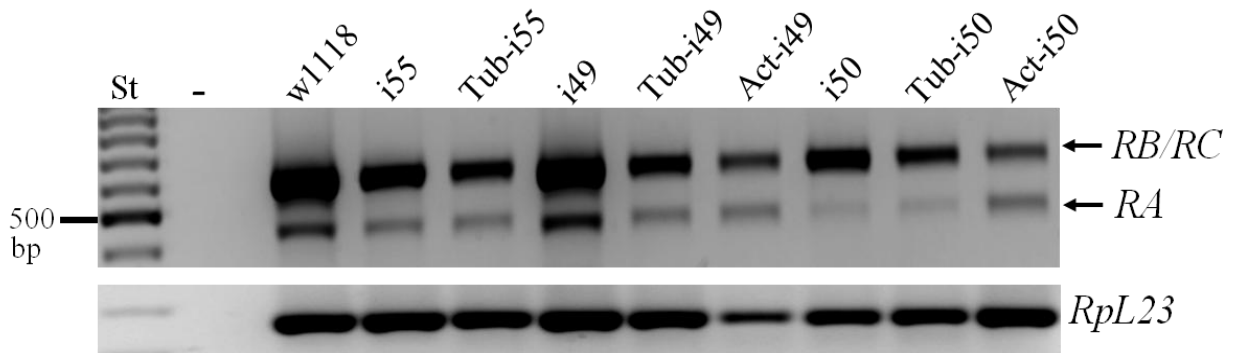
Eredményünk szerint, a kontroll törzshöz viszonyítva a del81 törzs nőstényei szignifikánsan kevesebb petét raktak, míg a peték életképességét nem érintette jelentősen a deléción, belőlük körülbelül azonos arányban keltek ki felnőtt muslicák. Tehát a két vizsgált tulajdonság közül csak a nőstények termékenységét érinti a *Gbs-70E RA* és az ennek megfelelő rövidebb protein hiánya.

### 6.4.3 *Gbs-70E* expresszió RNS interferenciával történő csendesítése

Mivel a del81 *Gbs-70E* deléciós törzs vizsgálata során tapasztalt élettartam csökkenés ellentétben áll egy korábbi publikáció (Magwire és mtsai., 2010) következtetéseivel, így eredményeinket RNS interferencia törzsek létrehozásával, és az interferenciával csökkentett *Gbs-70E* expressziójú törzsek életképességének és glikogéntartalmának vizsgálatával ellenőriztük.

A kísérlethez szükséges törzsek a w[1118]; P{GD13796}v24149 (röviden i49), a w[1118]; P{GD13796}v24150 (i50) és a P{KK108355}VIE-260B (i55) a Bécsi törzsgyűjteményből származtak. Az i55 törzsben lévő UAS konstrukt 392 bp hosszúságú, a *Gbs-70E* 1-es exon szekvenciájának megfelelő szakaszt tartalmaz, a konstrukt inzerció helye a 2-es kromoszóma. Az i49 és i50 törzsek w1118 genetikai háttérrel rendelkeznek, bennük azonos UAS konstrukt található, amely 301 bp hosszúságú, és a *Gbs-70E* 4-es exon szekvenciájának felel meg. Az i49 törzsben az inzerció helye a 2-es kromoszóma, míg az i50 törzs esetén a 3-as kromoszóma. A három RNS interferencia törzsben az UAS konstrukciót kétféle, aktin és tubulin, általános driver törzsszel keresztezve aktiváltuk, így jöttek létre a Tub-i55, Tub-i49, Act-i49, Tub-i50 és Act-i50 jelölésű utódtörzsek. Az i55 és az aktin driver törzs keresztezésével a konstruktot expresszáló utódok nem voltak életképesek, ezért az erre vonatkozó adatok hiányoznak. A keresztezések során létrejött utódokat a driver törzsek által

hordozott markerek alapján szelektáltuk. A keresztezett törzsek kontrolljaként az egyes szülői RNS interferencia törzseket használtuk. A génexpressziót a csendesített törzsekben és a szülői RNS interferencia törzsekben Gbs-70E1-3 jelű primerekkel (4. táblázat) végzett kvalitatív RT-PCR reakcióval ellenőriztük a *RpL23* háztartási gén kontroll mellett (22. ábra).



**22. Ábra: RNS interferenciával csökkentett *Gbs-70E* expressziójú törzsek és kontrolljaik vizsgálata RT-PCR reakcióval, Gbs-70E1-3 primerpárral**

w1118: kontroll törzs. i49, i50, i55: nem csendesített szülői *Gbs-70E* RNS interferencia törzsek. Act, Tub: aktin és tubulin driver segítségével csendesített törzsek. A PCR termékek futtatása 1 % agaróz gélen történt. St= Fermentas 100 bp standard. Háztartási kontroll gén: *RpL23*.

A *Gbs-70E* mRNS szintjének ellenőrzése során azt tapasztaltuk, hogy az RNS interferencia törzsekben a génexpresszió kevésbé csökkent, mint a korábban megvizsgált inzerciós és deléciós mutánsokban. Ezután megmértük az RNAi törzsek életképességét, és megvizsgáltuk a raktározott glikogén mennyiségét. Eredményeinket a 8. táblázat foglalja össze.

### 8. Táblázat: *Gbs-70E* RNS interferencia törzsek jellemzése

Törzs	Élethossz		Glikogéntartalom	
	Napok	±SEM (n)	(mg/mg)	±SD (n)
<b>i49</b>	50,2	±1,1 (203)	1,002	±0,06 (4)
<b>Act-i49</b>	56,6 **	±2,2 (80)	0,799***	±0,02 (4)
<b>Tub-i49</b>	63,4 ***	±3,1 (45)	0,922	±0,10 (4)
<b>i50</b>	46,0	±1,9 106)	0,996	±0,11 (4)
<b>Act-i50</b>	47,1	±2,5 (54)	0,893	±0,09 (5)
<b>Tub-i50</b>	51,3	±4,4 (41)	0,728***	±0,07 (7)
<b>i55</b>	54,8	±1,2 211)	0,983	±0,07 (5)
<b>Tub-i55</b>	66,1***	±3,0 (43)	0,702***	±0,03 (4)

SEM=középértékszórás, SD=szórás, n=darabszám. A glikogéntartalom feltüntetett értékei egységnyi fehérjemennyiségre (1 mg) értendők. A szignifikancia az ANOVA analízis szerint \*\* esetén  $p>0,01$ , \*\*\* esetén  $p>0,001$ . Azi49, i50, i55=szülői RNS interferencia törzsek. Act- és Tub- az aktin és tubulin driverrel csendesített törzsek nevének előtagja.

A 8. táblázat adatai szerint az irodalomban (Magwire és mtsai., 2010) leírtakhoz hasonló eredményt kaptunk: a csendesített törzsek élethossza a szülői RNS interferencia törzsekhez képest nőtt, szignifikáns a változás az Act-i49 törzs ( $p>0,01$ ), illetve a Tub-i49 és a Tub-i55 törzsek ( $p>0,001$ ) esetében. A glikogén szintje az Act-i49, a Tub-i50 és a Tub-i55 törzsek esetén kis mértékben, de szignifikánsan ( $p>0,001$ ) csökkent. Az élethossz növekedése és a glikogén tartalom csökkenése a létrehozott törzsekben minden esetben együttesen megfigyelhető fenotípusos változás volt.

## 7. Megbeszélés

### 7.1 A *Drosophila* PP1 glikogénkötő alegysége, a Gbs-70E fehérje jellemzése

A glikogén anyagcsere egyik kulcsenzime a protein foszfatáz 1 (PP1), amely holoenzimként, glikogénkötő regulátor alegységekhez kapcsolódva tölti be szerepét. A *Drosophila* PP1 katalitikus alegységgel kapcsolódó glikogénkötő alegységeket eddig nem jellemezték. A Flybase *Drosophila* adatbázisból elérhető adatokat felhasználva a *Drosophila* genomban szekvencia homológia alapján azonosítottunk két lehetséges glikogénkötő PP1 alegység gént, ezeknek Celera Genom jelölése *CG9238* és *CG9619* (Kókai és mtsai., 2001). A *CG9619* gént *Gbs-76A*-nak nevezték el Bennett és mtsai. (2006), a *CG9238* gént pedig *Gbs-70E*-nek hívtuk (Kerekes és mtsai., 2014).

A két génről átíródó fehérjék aminosav szekvenciáit összehasonlítva a humán és *Caenorhabditis elegans* glikogénkötő alegységek elsődleges szerkezetével, azt tapasztaltuk, hogy a fehérjék központi, erősen konzervált régiójában, a foszfatáz kötő motívumban (RVxF) és a glikogénkötő doménben is igen nagyfokú a hasonlóság (23. ábra). A glikogénkötő domén működéséről irodalmi adatok eddig nem voltak ismertek, viszont a PP1c kötésről korábbi kísérletes bizonyítékok álltak rendelkezésre. Ezek szerint a *Gbs-76A* fehérje mind a négy PP1c izoformával képes kölcsönhatni (Bennett és mtsai., 2006), *Gbs-70E* pedig a PP1c két (PP1-87B, PP1-96A) izoformájával alkothat komplexet (Giot és mtsai., 2003).

A *Gbs-70E* számos élettani folyamatban betöltött szerepéről több irodalmi adat is rendelkezésre állt (lásd: 3.7. fejezet). Az alegység jelentőségére utalt az is, hogy a *Gbs-70E* *C. elegans* homológjának (*H18N23.2*) inaktiválása embrionális letálist eredményezett (Rual és mtsai., 2004). A *Gbs-76A* gén kiütésekor vagy csendesítésekor letalitásról vagy egyéb fenotípus változásról nem számoltak be. Tehát a *Gbs-70E* gén fontosabbnak tűnik a *Gbs-76A*-nál, ezért kutatásaink célpontjául ezt választottuk.

```

PPP1R4_GL_ SKNEASGMVAPAVQEKK-----VKKRVSEADNQGGLALTMVKVFSEFDD 84
PPP1R5 HKAKSQ--NDWKCShNQ-----AKKRVVFADSKGLSLTAIHVFSDLPE 101
GBS70E SADLSPDTDADVADSASHSCICSKSDSNGEVSRGPKKHVIFADDEGLSLTEVRVMSEPSN 127
H18N23.2 YQSHSSSSSECEVDDLELFCAG---PLELKEEEKLRKSVRFADDCGHELYMVRVATEPSN 138
PPP1R6 ERRQKAAGAPGAACRPG-----CSQKLRVRFADALGLELAQVKVFNAGDD 124
GBS76A TTVDTLTDDEDDCRPQRIIRRCSSLKTGKTPPGTTPGRKKIVRFADVLGLDLADVKTFLEIP 480
PPP1R3_GM_ SRRGSDSSEDIYLDTPS-----SGTRVSEADSFGFNLVSVKEFDCWEL 85
* * * * * :

PPP1R4_GL_ P--LDMPFNITELL---DNIVSLTTAESESFVLDFS--QPSADYLDFFRNRLQADHVCLE 136
PPP1R5 EPAWDLQFDLLDLN---DISSALKHHEEKNLILDFP--QPSTDYLSFRSHFQKNFVCLE 155
GBS70E VPPYWSMKFLEQIT---QGLVSPHPDQ--WTVDFK--QPASDYLSFRQKIERDFVSL 179
H18N23.2 CPPKLSPSVLRRYRGESFEEEEMTTREPAPVWNLMFK--QPAADYVRFRENMETNKVSL 196
PPP1R6 TSVVPLHVLRLAIN---SDLCCSSQDLEFTLHCLVPDFPPPVEAADFGERLQRQLVCL 180
GBS76A TIPKSAFEDLEILES---EPPLQLGPKSDKLLMPLFQ---QPGGLPKFLDAVREKQVSL 534
PPP1R3_GM_ PSASTTFDLGTDIF-----HTEEYVLAPLFD---LPSSKEDLMQQLQIQKAIL 131
. . . . . **

PPP1R4_GL_ NCVLKDK---AIAGTVKVNLAFAEKTVKIRMTFTWKSQYDFPCQYVKD----TYAGSDR 189
PPP1R5 NCSLQER---TVTGTVKVKNVSEKVKQIRITFDWKNYTDVDCVYMKN----VYGGTDS 208
GBS70E NVIVKDEE-SIVVGTIKVKNIDFQKEIIVRVTWDDWKSQQDIFCTYARAYGPATCAHVVF 238
H18N23.2 NVILNNEA-YKVMGTIKVGNIAFEKSVFVRYTMNGWISYMDKAAIQPS-----TSKIQ 249
PPP1R6 RVTCSDLG---ISGTVRVCNVAFKQVAVRYTFSGWRSTHEAVARWRGP----AGPEGTE 233
GBS76A NAAVTDNINQTISSSVRVRNLDHFHKSVMHIRYSLDGWRSYADLQANYVEN----SCDGF 589
PPP1R3_GM_ STESLLGS-TSIKGIIRVLNVSEKLVYVRMSLDDWQTHYDILAEYVPN----SCDGET 185
: * : * * : * * : * : . * . : . :

PPP1R4_GL_ DTFSEDISLPE-KIQSYERMEFAVYYECNGQTYWDSNRGKNYRIIRAELKS-----T 240
PPP1R5 DTFSEFADLPP-VIPTEQKIEFCISYHANGQVFDNNDGQNYRIVHVQWKPdGVQTMAP 267
GBS70E DTFSEKITLP----PSSKRLEFCICYRTNETEYWDNNDGKNYTIKRSPPFY-----Y 286
H18N23.2 DTFKFDLDLPS-SVEKIHQIEFCICFKANGTEYWDSNSGNTYVLHCEQQQHP-----A 301
PPP1R6 DVFTFGFVPPFLELGSRVHFAVRYQVAGAEYWDNNDHRDYSLTC----- 279
GBS76A DTFTFVLFVFNLS--LHVQRLEFAVRFQCKGQGFWDNNYGANYCFQCLPSS----- 638
PPP1R3_GM_ DQSEFKIVLVPYQKDGSKVEFCIRYETSvGTfWNNNGTNYTFICQKKEQE-----PE 239
* * * : : * * : * * : * * : * * :

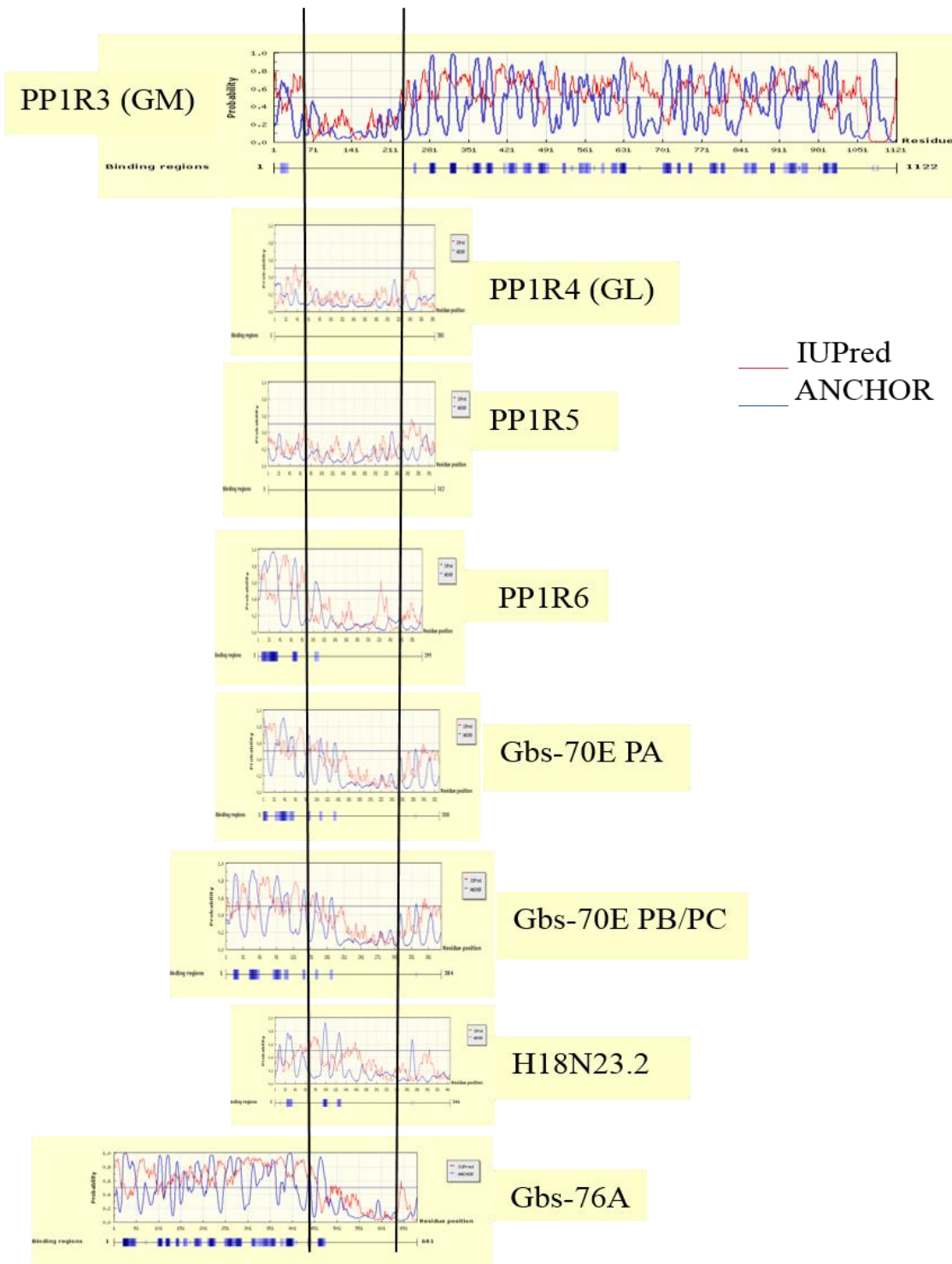
```

### 23. Ábra: Glikogénkötő PP1 alegységek szekvenciáinak összehasonlítása

Az ábrán a humán (PPP1R3/GM PPP1R4/GL, PPP1R5, PPP1R6), a *Caenorhabditis elegans* (H18N23.2) és a feltételezett *Drosophila* glikogénkötő alegységek (Gbs-70E, Gbs-76A) központi, konzervált régióinak ClustalW programmal készített szekvencia összehasonlítása látható. Piros színnel a PP1c kötésért felelős RVxF motívum látható, amit Ceulemans és Bollen (2006) alapján jelöltünk ki, míg kék színnel a glikogénkötő domén aminosavjait jelöltük, amit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam03370> szerint határoztunk meg.

A *Gbs-70E* génről 3 mRNS (*RA*, *RB*, *RC*) és 2 féle, egy rövidebb (*PA*) és egy hosszabb fehérje (*PB/PC*) képződhet (8. Ábra). Azonban a központi konzervált rész, ezen belül a glikogén-, és foszfatázkötő elemek mindkét izoformában megtalálhatóak (23. ábra). A konzervált részen kívüli szekvencia a humán glikogénkötő alegységekhez képest jóval változatosabb. A teljes Gbs-70E fehérje 42 %-ban hasonlít a humán homológokhoz (Kókai és mtsai., 2001), hiányzik belőle a  $G_M$ -ben található szarkoplazmatikus retikulum kötésért felelős 32 aminosavból álló C-terminális szakasz (Tang és mtsai., 1991), a  $G_M$  fehérjére jellemző két foszforilációs hely (Hubbard és Cohen, 1993), és a  $G_L$  alloszterikus regulációjáért felelős C-terminális 16 aminosav (Armstrong és mtsai., 1997).





**24. Ábra: A glikogénköti PP1 alegységek összehasonlítása rendezett és rendezetlen szerkezetű szakaszaik alapján**

A PPP1R4\_GL, PPP1R5, Gbs-70E PA és PB, H18N23.2, PPP1R6, Gbs-76A, PPP1R3\_GM fehérjék szekvenciáinak rendezett és rendezetlen elemeit a <http://anchor.enzim.hu/> oldalon található IUPred és Anchor programok segítségével elemeztük és a konzervált központi régióval való illesztéssel helyeztük egymás alá. Az ábrán láthatóak a fehérjék rendezetlen szakaszai (piros vonal) és más fehérjékhez való kötődési valószínűsége (kék vonal), a diagrammok alatt pedig kék színnel kiemelve látható a lehetséges fehérje kötőhelyek elrendeződése.

Ha a glikogénkötő fehérjéket rendezett és rendezetlen szakaszaik figyelembe vételével vizsgáljuk, a Gbs-70E fehérje hasonlósága a humán PPP1R6-tal szembevetve (24. ábra), ugyanis ehhez a fehérjéhez hasonlóan a konzervált régió kívül a rendezetlen szerkezetű N-terminális régió is megőrződött a Gbs-70E PB/PC fehérjénél. A Gbs-70E PA fehérjében az N-terminális rendezetlen szakasz rövidebb, de ez az izoforma is hasonló szerkezetű a PPP1R6-hoz. Az N-terminális szakasz szerepe nem ismert, feltehetőleg fehérje-fehérje kölcsönhatások helyszíne lehet. Ezt támasztja alá a fehérjék Anchor programmal történő vizsgálata is, mely több lehetséges kötőhelyet jósol ezen a szakaszon. A Gbs-70E ezen feltételezett kötőhelyek tekintetében is a PPP1R6-hoz hasonló (24. ábra).

Munkánk első felében kísérleteinkkel, élesztő-kéthibrid módszerrel (9. ábra), immunprecipitációval és pull down technikával (10. ábra), illetve szedimentációs kísérlettel (11. ábra) bizonyítottuk, hogy a Gbs-70E konzerválódott fehérjerészletei, a foszfatázkötő motívum és a glikogénkötő domén funkcionálisan működőképes. Az eddig leírt két PP1c izoforma (Pp1-87B és Pp1-96A; Giot és mtsai., 2003) mellett eredményeink szerint tehát a Gbs-70E a másik két *Drosophila* PP1c izoenzimmel is képes kölcsönhatni. Annak ellenére, hogy a foszfatáz kötő motívumban egy aminosavcsere figyelhető meg (az RVxF helyett HVxF; 23. ábra), a *Drosophila* Gbs-70E a PP1 alegységének tekinthető. Ezen kívül, szedimentációs kísérlettel (11. ábra) igazoltuk a Gbs-70E PA és a glikogén *in vitro* kölcsönhatását is: tehát a fehérje valóban a *Drosophila* PP1c glikogénkötő alegységének tekinthető.

A Gbs-70E foszfatáz aktivitásra kifejtett hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a glikogén lebontásában kulcsszerepet játszó foszforiláz-a defoszforilációja során a rekombináns Gbs-70E PA fehérje csökkenti a foszfatáz aktivitását (12. ábra). Ugyancsak gátló hatást tapasztaltunk miozin könnyű lánc szubsztráttal is, amely a PP1 ismert szubsztrátja, de a glikogén metabolizmusban nem játszik szerepet (13. ábra). Az aktivitás csökkentése, és a szubsztrát specificitás hiánya a humán G<sub>L</sub> és G<sub>M</sub> glikogénkötő alegységeknél megfigyeltektől különbözik. Ez arra utalhat, hogy a Gbs-70E egy olyan ősi PP1c regulátor alegység, amely fiziológiai körülmények között nem befolyásolja az enzimaktivitást, és feladata valószínűleg a PP1 és a glikogén, illetve kölcsönható partnereinek térbeli közelségbe hozása. A Gbs-70E PA fehérje lehetséges kölcsönható partnereit mutatja be a 9. táblázat, amelyet Giot és munkatársai (2003) élesztő kéthibrid kísérletei alapján állítottunk össze. A nagyszámú kölcsönható partner arra utal, hogy a Gbs-70E PA hálózatképző, úgynevezett scaffolding fehérjeként működhet. A lehetséges kölcsönható

partnerek sokfélék, több kináz, foszfatáz, foszfatáz inhibitor és foszforilációval szabályozható fehérje is szerepel köztük.

### 9. Táblázat: A Gbs-70E PA kölcsönható fehérjei Giot és mtsai. (2003) alapján

<i>CG kód</i>	<b>Név</b>	<b>Jellemző</b>
<i>CG6593</i>	PP1-96A	foszfatáz
<i>CG10908</i>	Der-1	proteáz
<i>CG1104</i>		ligáz
<i>CG11138</i>		cink-ujj fehérje
<i>CG11164</i>		ribunukleáz
<i>CG11230</i>		<i>visszavont gén</i>
<i>CG12620</i>		foszfatáz inhibitor2
<i>CG13057</i>	Retinin	
<i>CG14339</i>		
<i>CG15631</i>		
<i>CG2331</i>	TER94	ATPáz, aszpartát dekarboxiláz
<i>CG3283</i>	SdhB	szukcinát dehidrogenáz
<i>CG3645</i>		tRNS dihidrouridin szintáz
<i>CG4591</i>	Tsp86D	tetraspanin
<i>CG5354</i>	pie	cink-ujj fehérje
<i>CG5642</i>		transzláció iniciációs faktor
<i>CG5650</i>	PP1-87B	foszfatáz
<i>CG6767</i>		ribóz foszfát difoszfokináz
<i>CG7001</i>	Pk17E	kináz, ATP kötő
<i>CG7324</i>		Rab-GTPáz
<i>CG7954</i>	stck	cink-ujj fehérje
<i>CG8634</i>	Cpr65Ec	kutikula alkotórész
<i>CG8808</i>	Pdk	piruvát dehidrogenáz kináz

CG kód = Celera Genom jelölés

A kölcsönhatások kialakításának lehetőségét alátámasztja a Gbs-70E fehérje N-terminális részen található rendezetlen szerkezetű szakasz (24. ábra), amely több feltételezett kötőhelyet is tartalmaz. A Gbs-70E PA fehérje N-terminális régiója rövidebb, mint a PB/PC formáké, így a rövidebb izoforma kölcsönható partnerei a PB/PC izoforma kölcsönhatóitól eltérőek lehetnek, ami arra utal, hogy a PA funkcionális jelentősége a hosszabb izoformától különbözhet.

## 7.2 A *Gbs-70E* gén expressziós mintázata

Az expressziós mintázat egyedfejlődési, szervi meghatározása, az egyes mRNS izoformák bizonyos egyedfejlődési állapotokban való megjelenése információval szolgálhat az adott gén szerepéről. A *Drosophila Gbs-70E* expressziós mintázatát mRNS szinten határoztuk meg. Ismert volt, hogy 3 féle transzkriptum képződhet a génről (8. ábra), eredményeink szerint ezek közül a hosszabb *RB* és *RC* minden fejlődési stádiumban és nemben expresszálódik, a rövidebb *RA* csak az embriókban és a nőstényekben fejeződik ki (14. ábra), az utóbbiakban elsősorban az ováriumban található (15. ábra). Eredményeink összhangban vannak a Flybase *Drosophila* adatbázis *Gbs-70E* génre vonatkozó DNS chip, RNS szekvenálás, *in situ* hibridizáció és EST adataival (<http://www.flyexpress.net/search/genes/CG9238/images/BDGP/LDVO>). Ez alapján arra következtettünk, hogy az *RA* mRNS anyai eredetű transzkriptum, amelynek az embrionális fejlődésben lehet szerepe.

A *Gbs-70E* ortológjainak vizsgálata szolgáltathat információt arra vonatkozóan, hogy a homológ géntermékek konzerválódtak-e, és ebből következtethetünk arra is, hogy szerepük mennyire létfontosságú a szervezet működésében. A *Gbs-70E* ortológok fehérjeszekvenciáinak elemzésével megállapítottuk, hogy ezen fehérjék evolúciós változása (17. ábra) tükrözi a fajok evolúciós viszonyait (16. ábra). Ezután a *Gbs-70E* ortológok transzkriptjeinek elemzésével a *D. melanogaster*-nél megfigyelt szexspecifikus expresszió konzerválódását vizsgáltuk. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy csak a *D. melanogaster*-hez evolúciósan közeli fajok expressziós mintázata hasonló, azonban az *RA* variáns megjelenése evolúciósan nem konzerválódott (18. ábra). Míg a *Gbs-70E* ortológok fehérjeszekvenciája az általános trendet követi, a transzkriptumok *Drosophila melanogaster*-nél megfigyelt szexspecifikus mintázata nem mutatható ki több vizsgált fajban. Tehát a *Gbs-70E* PA izoforma különleges szerepére vonatkozó feltevésünket az evolúciós vizsgálatok nem támasztották alá.

## 7.3 A *Drosophila Gbs-70E* funkciói

Korábbi munkánk során, *Drosophila* kalpainok funkcionális vizsgálatára kidolgoztunk egy kutatási stratégiát (Kókai és mtsai., 2012), amit a *Gbs-70E* foszfatáz alegység tanulmányozásában is felhasználtunk. Mindkét, hazai együttműködésben végzett munkánk

során molekuláris genetikai módszerekkel csökkentett génexpressziójú *Drosophila* törzseket hoztunk létre, és ezeket felhasználva vizsgáltuk a deletált gén funkcióját. A *Drosophila Gbs-70E* géntermék funkcionális vizsgálatához kísérleteinkben egy, az irodalomban korábban már leírt GT1 inzerciós törzset (Girardot és mtsai., 2004; Chen és mtsai., 2007; Kong és mtsai., 2010) és egy funkcionális vizsgálatokhoz még nem használt EP jelű P-elem tartalmú inzerciós törzset (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Reports/20219.html>) használtunk. Az EP inzerciós törzs segítségével deléciós mutánsokat (del81, del277) hoztunk létre (19. és 20. ábra). A del277 törzsből az 1-es exon és a 2-es exon egy része, míg a del81-es mutánsból a teljes 1-es és 2-es exon hiányzik. A törzsek *Gbs-70E* expressziós szintjét RT-PCR reakcióban határoztuk meg. Ez alapján elmondható, hogy már a P-elem inzerciók is érintik a gén expresszióját, viszont a deléciók hatása sokkal jelentősebben: a del81 deléciós mutáns szinte nullmutánsnak tekinthető (21. ábra). A deléció letalitást egyik esetben sem okozott, tehát a *Gbs-70E* nem esszenciális.

Mivel bizonyítottuk, hogy a *Gbs-70E* foszfatázokhoz kötődik és glikogénkötő doménje működőképes, feltételeztük, hogy szerepet játszik a *Drosophila*-ban raktározott glikogén szintjének kialakításában. Ezzel összhangban a legalacsonyabb *Gbs-70E* expressziós szintet mutató del81 deléciós mutánsban található a legkevesebb glikogén (6. táblázat). Ezzel bizonyítottuk, hogy a *Gbs-70E* egy funkcionális glikogénkötő PP1 alegységnek tekinthető. Bár a gén megnevezésekor ezt már feltételezték, mi szolgáltatunk az első kísérletes adatsort, ami a predikciók helyességét igazolta.

Irodalmi adatokból ismert volt, hogy a *Gbs-70E* befolyásolhatja a *Drosophila* élettartamát is. Magwire és mtsai. (2010) arról számoltak be, hogy az általuk vizsgált, *Gbs-70E* expressziót érintő törzsek esetében az élethossz megnőtt. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy a del81 deléciós mutánsban az *Gbs-70E* expresszió nagyfokú csökkentése az élethossz szignifikánsan lerövidíti (6. táblázat). Az ellentmondás feloldására további ellenőrző kísérleteket végeztünk. Összehasonlító kísérleteinkhez RNS interferencia törzseket használtunk. A szülői RNS interferencia törzseket aktin és tubulin általános driverekkel kereszteztük. A keresztezett törzsek kontrolljaként az egyes szülői RNS interferencia törzseket használtuk. Ez az összehasonlítás genetikai kritériumok szerint nem teljesen korrekt, ugyanis a keresztezéssel előállított utódtörzsek genetikai háttere a szülői törzsektől különbözik. Ennek ellenére az adatok tájékoztató jelleggel értékelhetőek. A *Gbs-70E* mRNS szintjének ellenőrzése során azt tapasztaltuk, hogy az RNS interferencia kis mértékben csökkenti a génexpressziót (22. ábra). Az inzerciós és deléciós mutáns törzsek funkcionális

vizsgálatához hasonlóan itt is elvégeztük az életképesség és a raktározott glikogén mennyiségének mérését. Az RNS interferenciával csendesített törzsek élethossza a kontrollhoz képest nagyobb, míg a glikogéntartalma kisebb volt (8. táblázat).

Tehát a *Gbs-70E* expressziójának kismértékű csökkenése (az RNS interferencia törzsek esetében) az élettartamra pozitív hatással van, viszont az expresszió nagyfokú csökkenése (del81 deléziós mutáns esetében) az élethosszt szignifikánsan csökkenti. Feltételezzük, hogy az RNS interferencia módszerével elért *Gbs-70E* expresszió enyhe csökkenése a glikogén metabolizmus kismértékű lassulását eredményezi, ami a metabolikus terhelés csökkentésén keresztül növelheti meg az élethosszt. A genetikai módszerrel elért majdnem teljes *Gbs-70E* génkiütés viszont a *Gbs-70E* ellentétes szerepére utal. Ilyen tekintetben a molekuláris genetikai módszerekkel előállított deléziós mutánsok vizsgálata alapján levont következtetések megbízhatóbbak. Az RNS interferencia kisebb hatékonysága miatt az eredmények csak a génexpresszió kis csökkenésének következményeit mutatják és a gén funkcióját illetően félrevezetőnek bizonyultak. Az eredmények éretékelésekor nem feledkezhetünk meg arról sem, hogy az összehasonlításhoz használt szülői törzsek és a csendesített törzsek genetikai háttere nem egyezett meg teljes mértékben, ezért elképzelhető, hogy az életképesség változását a marker génekek különbözősége okozta.

Mivel a génexpressziós mintázat vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a rövid mRNS csak az embriókban és a nőstények ováriumában mutatható ki (14. és 15. ábra), valamint láttuk a del81 törzs esetében a *Gbs-70E* delézió élettartamra gyakorolt hatását (6. táblázat), feltételeztük, hogy a *Gbs-70E* szerepet játszhat az embriogenezisben. A nőstények termékenységének összehasonlítása során várakozásunknak megfelelően jelentős különbséget tapasztaltunk a del81-es törzs nőstényei által lerakott peték számában (7. táblázat). A *Gbs-70E* tehát valóban szerepet játszhat az embrionális fejlődés korai szakaszában.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a *Gbs-70E* nemcsak a *Drosophila* glikogén metabolizmusban játszik szerepet, hanem más élettani folyamatokban: az élettartam meghatározásában, és az embriogenezis korai szakaszában is szerepet tölt be. A gén deléciója letalitást nem okoz, ezért szerepe a *Drosophila*-ban nem létfontosságú. A *Gbs-70E* glikogénkötő alegység a szerkezeti és biokémiai tulajdonságai alapján tehát a humán G alegységekhez kevésbé hasonlító, ősi PP1 regulátor fehérjének tekinthető, ami szerepét hálózatképző tulajdonsága révén, kölcsönható partnereivel kölcsönhatásban töltheti be.

Ha összehasonlítjuk a fenti eredményeket a korábbi, *Drosophila* kalpainok funkcionális vizsgálatára irányuló vizsgálatokkal, számos hasonlóságot találhatunk. A *Drosophila* foszfatáz regulátor alegység vizsgálatára és korábbi munkánk során a *Drosophila* kalpainok vizsgálatára is azonos kísérleti megközelítést alkalmaztunk: csökkentett génexpressziójú törzsek létrehozása és jellemzése után funkcionális vizsgálattal határoztuk meg az adott gének szerepét. A génexpressziót mind a két vizsgálatban klasszikus genetikai módszerekkel (deléciós törzsek) illetve RNS interferenciával manipuláltuk. Mindkét vizsgálat során a humán gének számához viszonyítva kevesebb volt a *Drosophila* ortológok száma: a kalpain esetében 4 *Drosophila* és 16 humán, míg a glikogénköti alegység esetén 2 *Drosophila* és legalább 4 humán homológ létezik. A *Drosophila* paralógok közül az egyik szerepe bizonyult meghatározónak mindkét vizsgálatban. Az általunk jellemzett kalpain deléciós mutáns törzsek segítségével együttműködő partnereink bizonyították a *Drosophila* *CalpB* központi szerepét a sejtváándorlás mechanizmusában (Kókai és mtsai., 2012). A *Drosophila* glikogénköti PP1 alegység vizsgálatával azt bizonyítottuk, hogy a *Gbs-70E* szabályozza a glikogéntartalmat (Kerekes és mtsai., 2014). Eredményeink nem mindig egyeztek meg a humán homológokra vonatkozó megfigyelésekkel: a kalpain deléciós mutánsok a várttal ellentétben életképesek, a foszfatáz regulátor alegységnek pedig a glikogén anyagcserén kívül más folyamatokban, így az élettartam meghatározásában és a fertilitásban is szerepe van. Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk használt molekuláris genetikai megközelítéssel *Drosophila* modell organizmusban az egyes gének szerepe jól meghatározható.

## 8. Összefoglalás

A poszttranszlációs módosítások fontos szerepet töltenek be a sejtéletbeni folyamatokban, ezek közül a foszforiláció és a proteolízis kiemelt jelentőségű. Együttműködő partnereinkkel korábbi munkánk során kialakítottunk egy olyan molekuláris genetikai kísérleti stratégiát, amivel sikerült bizonyítaniuk egy kalcium függő proteáz, a CalpB szerepét a *Drosophila melanogaster* határsejtek migrációjában. Az együttműködés folytatásaként hasonló kutatási stratégiát alkalmaztunk a *Drosophila* protein foszfatáz 1 (PP1) egyik feltételezett glikogénkötő regulátor alegységének tanulmányozására és fiziológiai szerepének feltárására.

A glikogén metabolizmus szabályozása a foszforilációs-defoszforilációs reakciók jól ismert példája, a folyamat egyik szabályozó enzime a PP1. A PP1 holoenzimet a glikogénhez irányító glikogénkötő alegységeit ezidáig nem jellemezték alaposan az ecetmuslicában. Az adatbázisokban található gén és fehérje szekvenciák analízisével két potenciális *D. melanogaster* PP1 kölcsönható fehérjét azonosítottunk, munkánk során ezek közül a *Gbs-70E* génnel és géntermékével foglalkoztunk. Azt találtuk, hogy a *Gbs-70E* protein glikogénkötő és PP1 katalitikus alegységet kötő szerkezeti elemei nagymértékben konzerválódtak az evolúció során. Munkánk első részében biokémiai kísérletekkel igazoltuk a két konzervált kötőhely működőképességét, és igazoltuk, hogy a *Gbs-70E* megköti a PP1 katalitikus alegység összes izoformáját valamint a glikogént, tehát valóban a PP1 glikogénkötő alegységének tekinthető. A *Gbs-70E* génről átíródó legrövidebb és a két hosszabb transzkript között különbséget téve feltártuk a génexpressziós mintázatot a különböző fejlődési stádiumokban és testrészekben. Azt találtuk, hogy a legrövidebb transzkript csak az embriókban és a nőstények ováriumában mutatható ki, ami anyai hatásra és az embriogenezisben játszott szerepre utal. Molekuláris genetikai kísérletekben a gén deléciójával megállapítottuk, hogy az *Gbs-70E* expressziós szintjének drasztikus csökkentése a glikogén szint és az élettartam szignifikáns csökkenését eredményezi és csökkenti a nőstények fertilitását. Tehát bebizonyítottuk, hogy a *Gbs-70E* glikogénkötő alegységnek a PP1 regulátoraként a *Drosophila* glikogén metabolizmusban, a korai embriogenezisben és az élettartam kialakításában van szerepe.



## 9. Summary

Posttranslational modifications of proteins have important roles in cell physiology, and out of the numerous modifications, protein phosphorylation and proteolysis are of special interest. In our previous study we introduced a molecular genetics based experimental strategy with our collaborators and they used it for revealing the role of a calcium dependent protease, CalpB in the migration of the border cells in *Drosophila melanogaster*. As a continuation of this collaboration we adopted a similar approach to investigate the physiological function of a putative glycogen binding regulatory subunits of the protein phosphatase 1 (PP1) holoenzyme, in *Drosophila*.

The regulation of glycogen metabolism by phosphorylation-dephosphorylation reactions is well-known. Based on analogies we proposed that PP1 was an important regulator of the process in the fruit flies. The glycogen binding subunits of the PP1 that target the phosphatase to glycogen have not been characterised yet in the fruit flies. Based on gene and protein sequence analysis we identified two putative *D. melanogaster* PP1 glycogen binding subunits, and in our present work we studied one of them, the *Gbs-70E* gene and its gene product. We noted that the glycogen and PP1 catalytic subunit binding structural elements are well conserved in the *Gbs-70E* protein. First we tested with biochemical experiments the role of these two regions, and demonstrated that *Gbs-70E* was able to bind to all of the PP1 catalytic subunit isoforms and to glycogen. Thus we proved that *Gbs-70E* was indeed a functional glycogen binding subunit of PP1. Next we investigated the gene expression patterns of the shortest and the two longer transcripts during ontogeny and in different body parts. The shortest mRNA is present only in embryos and in the ovary of females, suggesting a maternal origin and the role of the shorter protein in embryogenesis. After the deletion of the gene with molecular genetic methods we found that the drastical reduction of *Gbs-70E* expression resulted in the decrease of glycogen content and the lifespan of the imagos, and in the decline of the fertility of females. In conclusion, we found that the *Gbs-70E* glycogen binding regulatory subunit of PP1 has a role in the regulation of glycogen metabolism, determination of lifespan, and the embryogenesis in *Drosophila*.

## 10. Irodalomjegyzék

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*. 8,121-40

Armstrong CG, Browne GJ, Cohen P, Cohen PT. (1997) PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett*. 418, 210-214

Ashburner M. (1989) *Drosophila. A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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

Azam M, Andarabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti A. (2001) Disruption of the mouse -  $\mu$ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol*. 21, 2213-2220

Bahri SM, Chia W. (1994) DPhK-gamma, a putative *Drosophila* kinase with homology to vertebrate phosphorylase kinase gamma subunits: molecular characterisation of the gene and phenotypic analysis of loss of function mutants. *Mol Gen Genet*. 245, 588-597

Bai G, Zhang ZJ, Amin J, Deans-Zirattu SA, Lee EZ. (1988) Molecular cloning of a cDNA for the catalytic subunit of rabbit muscle phosphorylase phosphatase. *FASEB J*. 2, 3010-3016

Barford D. (1999) Structural Studies of Reversible Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases. *Biochem Soc Trans*. 27, 751-766

Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, Hoskins RA, Spradling AC. (2004) The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes. *Genetics*. 167, 761-781

Bennett D, Lyulcheva E, Alphey L, Hawcroft G. (2006) Towards a comprehensive analysis of the protein phosphatase 1 interactome in Drosophila. *J Mol Biol*. 364, 196e212. Erratum in: *J Mol Biol*. 2009. 387, 518

Bennett D, Alphey L. (2007) Protein phosphatase protocols. *Methods Mol Biol*. 365, 155-179

Berndt N, Cohen PT. (1990) Renaturation of protein phosphatase 1 expressed at high levels in insect cells using a baculovirus vector. *Eur J Biochem*. 190, 291-217

Bialojan C, Takai A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J*. 256, 283-290

Boratkó A, Gergely P, Csontos Cs. (2013) RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners. *Cell Commun Signal*. 11, 2

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254

Broach JR. (2012) Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*. 192 (1), 73-105

Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*. 24 (4), 371-81

Ceulemans H, Bollen M. (2006) A tighter RVxF motif makes a finer Sift. *Chem Biol*. 13, 6-8

Chen X, LiY, Huang J, Cao D, Yang G, Liu W, Lu H, Guo A. (2007) Study of tauopathies by comparing Drosophila and human tau in Drosophila. *Cell. Tissue Res*. 329, 169-178

Cheng C, Huang D, Roach PJ. (1997) Yeast PIG genes: PIG1 encodes a putative type 1 phosphatase subunit that interacts with the yeast glycogen synthase Gsy2p. *Yeast*. 13, 1-8

Clark AG, és munkatársai. (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Drosophila 12 Genomes Consortium. Nature*. 450, 203-218

Cohen, PT. (1988) Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett*. 232, 17-23

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, 245-251

Cohen PTW. (2004) Overview of protein serine/threonine phosphatases. In: Arino J, Alexander DR editors. *Topics in Current Genetics*. Berlin Heidelberg Springer-Verlag. pp. 1-20

Cozzone AJ. (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol*. 42, 97-125

Cronin SJ, Nehme NT, Limmer S, Liegeois S, Pospisilik JA, Schramek D, Leibbrandt A, Simoes Rde M, Gruber S, Puc U, Ebersberger I, Zoranovic T, Neely GG, von Haeseler A, Ferrandon D, Penninger JM. (2009) Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science*. 325 (5938), 340-3

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J*. 351, 95-105

Deák I, Bellamy PR, Bienz M, Dubuis Y, Fenner E, Gollin M, Rähmi A, Ramp T, Reinhardt CA, Cotton B. (1982) Mutations affecting the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 69, 61-81

Denu JM, Dixon JE. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2, 633-641

Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* 448, 151-156

Dombrádi V, Hajdu J, Friedrich P, Bot G. (1985) Purification and characterization of glycogen phosphorylase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 15, 403-410

Dombrádi V, Dévay P, Friedrich P, Bot G. (1986) Regulation of glycogen phosphorylase in *Drosophila melanogaster* by reversible phosphorylation-dephosphorylation. *Insect Biochem.* 16, 557-565

Dombrádi V, Risnik V, Erdődi F, Bot G, Friedrich P. (1987a) Regulation of phosphorylase kinase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* 17, 579-585

Dombrádi V, Gergely P, Bot G, Friedrich P. (1987b) Purification of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun.* 144, 1175-1181

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, 603-610

Dombrádi V, Axton JM, Barker HM, Cohen PT. (1990) Protein phosphatase 1 activity in *Drosophila* mutants with abnormalities in mitosis and chromosome condensation. *FEBS Lett.* 275, 39-43

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

Dombrádi V, Kókai E, Farkas I. (2004) Protein phosphatase 1. *Topics Curr Genet.* 21-44

Dunn JS, Mlynarski WM, Pezzolesi MG, Borowiec M, Powers C, Krolewski AS, Doria A. (2006) Examination of PPP1R3B as a candidate gene for the type 2 diabetes and MODY loci on chromosome 8p23. *Ann Hum Genet.* 70, (5) 587-93

Dutt P, Croall DE, Arthur JSC, DeVeyra T, Williams K, Elce JS, Greer PA. (2006) m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BioMed Central Dev Biol.* 6, 3

Eanes WF, Merritt TJ, Flowers JM, Kumagai S, Sezgin E, Zhu CT. (2006) Flux control and excess capacity in the enzymes of glycolysis and their relationship to flight metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 103, 19413-19418

Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P, Barford D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol.* 254, 942-959

Farkas I, Dombrádi V, Miskei M, Szabados L, Koncz C. (2007) Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci.* 12, 169-176

Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A. (2003) Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun.* 311 (4), 1117-32

Fischer EH, Krebs EG. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* 216 (1): 121–132

Friedrich P, Bozóky Z. (2005) Digestive versus regulatory proteases: on calpain action in vivo. *Biol Chem.* 386(7), 609-12

Gietz RD, Triggs-Raine B, Robbins A, Graham KC, Woods RA. (1997) Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cel Biochem.* 172, 67-79

Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrolla S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley Jr. RL, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg

JM. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 302, 1727-1736

Girardot F, Monnier V, Tricoire H. (2004) Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*. 5, 74

Gloor GB, Engels WR. (1992) Single fly DNA preps for PCR. *Dros Inf Ser*. 71, 148-149

Goll DE, Thompson VF, LI H, Wei W, Cong J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev*. 83, 731-801

Harlow E, Lane D. (1988) *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Hartshorne D, Ito M, Erdódi F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*. (4):325-41

Hayashida Y, Goi T, Hirono Y, Katayama K, Urano T, Yamaguchi A. (2005) PPP1R3 gene (protein phosphatase 1) alterations in colorectal cancer and its relationship to metastasis. *Oncol Rep*. 13, 1223-7

Helps NR, Luo X, Barker HM, Cohen PT. (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*. 349 (Pt 2), 509–518

Hsiu-Yu L, Pflieger CM. (2013) Mutation in E1, the Ubiquitin activating enzyme, reduces *Drosophila* lifespan and results in Motor Impairment. *PLoS One* 8, e32835.

Huang FL, Glinsmann WH. (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*. 70 (2), 419-26

Huang TY, DerMardirossian C, Bokoch GM. (2006) Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Cur. Op. In Cell Biol*. 18, 26-31

Hubbard MJ, Cohen P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci.* 18, 172-177

Hunter T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80, 225-236

Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem.* 272 (52), 32719-22

Ingebritsen TS, Cohen P. (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* 221, 331-338

Jackson MD, Denu JM. (2001) Molecular reaction of protein phosphatases – insights from structure and chemistry. *Chem Rev* 101, 2313-2340

Jékely G, Friedrich P. (1999) Characterization of two recombinant *Drosophila* calpains. CALPA and a novel homolog, CALPB. *J Biol Chem.* 274 (34), 23893-900

Kennelly PJ. (2003) Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J.* 370, 373-389

Kerekes É, Kókai E, Páldy FS, Dombrádi V. (2014) Functional analysis of the glycogen binding subunit CG9238/Gbs-70E of protein phosphatase 1 in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol.* 49, 70-9.

Kiss A, Bécsi B, Kolozsvári B, Komáromi I, Kövér EK, Erdődi, F. (2012) Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS J.* 280, 612-626

Kita A, Matsunaga S, Takai A, Kataiwa H, Wakimoto T, Fusetani N, Isobe M, Miki K. (2002) Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure.* 10, 715-24



Kókai E, Gausz J, Dombrádi V. (2001) Biochemical and genetic analysis of the PPP family of protein phosphatases in *Drosophila melanogaster*. Protein modules in cellular signalling. In: Heilmeyer, L., Friedrich, P. (Eds.), NATO Science Series. IOS Press, pp. 222-231

Kókai E, Tantos A, Vissi E, Szőőr B, Tompa P, Gausz J, Alphey L, Friedrich P, Dombrádi V. (2006) CG15031/PPYR1 is an intrinsically unstructured protein that interacts with protein phosphatase Y. *Arch Biochem Biophys.* 451, 59-67

Kókai E, Bagossi P, Dombrádi V. (2008) A protein foszfatáz 1, egy sokoldalú ősi enzim. *Biokémia.* 32, 22-33

Kókai E, Páldy FS, Somogyi K, Chougule A, Pál M, Kerekes É, Deák P, Friedrich P, Dombrádi V, Ádám G. (2012) CalpB modulates border cell migration in *Drosophila* egg chambers. *BMC Dev Biol.* 12, 20.

Kong EC, Allouche L, Chapot PA, Vranizan K, Moore MS, Heberlein U, Wolf FW. (2010) Ethanol-regulated genes that contribute to ethanol sensitivity and rapid tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res.* 34, 302-316

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685

Lee EY, Silberman SR, Ganapathi MK, Petrovic S, Paris H. (1980) The phosphoprotein phosphatases: properties of the enzymes involved in the regulation of glycogen metabolism. *Adv Cycl Nucl Res.* 13, 95-131

Lo S, Russell JC, Taylor AW. (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol.* 28 (2), 234-236

Machida S, Yuan YA. (2013) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* Dax1 forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding. *Mol Plant.* 4, 1290-300

MacKintosh C, Cohen P. (1989) Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem J.* 262, 335-339

Magwire MM, Yamamoto A, Carbone MA, Roshina NV, Symonenko AV, Pasyukova EG, Morozova TV, Mackay TF. (2010) Quantitative and molecular genetic analyses of mutations increasing *Drosophila* life span. *PLoS Genet.* 6, e1001037.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298, 1912-1934

Maynes JT, Bateman KS, Cherney MM, Das AK, Luu HA, Holmes CF, James MN. (2001) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem.* 276, 44078-82

Mohammad F, Singh P, Sharma A. (2009) A *Drosophila* systems model of pentylentetrazole induced locomotor plasticity responsive to antiepileptic drugs. *BMC Syst Biol.* 3, 11

Montori-Grau M, Maria Guitart M, Cèlia García-Martínez C, Anna Orozco A, Anna Maria Gómez-Foix AM. (2011) Differential pattern of glycogen accumulation after protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit PPP1R6 overexpression, compared to PPP1R3C and PPP1R3A, in skeletal muscle cells. *BMC Biochem.* 12, 57

Morozova TV, Anholt RR, Mackay TF. (2006) Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol.* 7, R95

Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ, Knoblich JA. (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature.* 458, 987-992

Munro S, Ceulemans H, Bollen M, Diplexcito J, Cohen PTW. (2005) A novel glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 that is regulated by insulin and shows differential tissue distribution in humans and rodents. *FEBS J.* 272, 1478-1489

Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol.* 153 (5),1011-22

Paetzel M, Karla A, Strynadka NCJ, Dalbey RE. (2002) Signal peptidases. *Chem Rev.* 102, 4549-4579

Peggie MW, MacKelvie SH, Bloecher A, Knatko EV, Tatchell K, Stark MJ. (2002) Essential functions of Sds22p in chromosome stability and nuclear localization of PP1. *J Cell Sci.* 115 (Pt 1), 195-206

Ramaswamy NT, Li L, Khalil M, Cannon JF. (1998) Regulation of yeast glycogen metabolism and sporulation by Glc7p protein phosphatase. *Genetics.* 149, 57-72

Rual JF, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot AS, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhoute J, Orkin SH, Hill DE, van den Heuvel S, Vidal M. (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeomebased RNAi library. *Genome Res.* 14, 2162-2168

Sambandan D, Yamamoto A, Fanara JJ, Mackay TFC, Anholt RRH. (2006) Dynamic genetic interactions determine odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 174, 1349-1363

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467

Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T, Nagao M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn. J Cancer Res.* 81, 1272-1280

Shulman JM, Feany MB. (2003) Genetic modifiers of tauopathy in *Drosophila*. *Genetics.* 165 (3), 1233-1242

Silberman SR, Speth M, Nemani N, Ganapathi MK, Dombrádi V, Paris H, Lee EZ. (1984) Isolation and characterization of rabbit skeletal muscle protein phosphatases C-I and C-II. *J Biol Chem.* 259, 2913-2922

Stuart JS, Frederick DL, Varner CM, Tatchell K. (1994) The mutant type 1 protein phosphatase encoded by *glc7-1* from *Saccharomyces cerevisiae* fails to interact productively with the GAC1-encoded regulatory subunit. *Mol Cell Biol.* 14, 896-905

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.(2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 28, 2731-2739

Tang PM, Bondor JA, SwiderekKM, DePaoli-Roach AA. (1991) Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *J Biol Chem.* 266 (24), 15782-15789

Toole BJ, Cohen PT. (2007) The skeletal muscle-specific glycogen-targeted protein phosphatase 1 plays a major role in the regulation of glycogen metabolism by adrenaline in vivo. *Cell Signal.* 5, 1044-55

Tu J, Song W, Carlson M. (1996) Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 16 (8), 4199-206

Tung HY, Resink TJ, Hemmings BA, Shenolikar S, Cohen P. (1984) The catalytic subunits of protein phosphatase-1 and protein phosphatase 2A are distinct gene products. *Eur J Biochem.* 138, 635-641

Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP. (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol.* (8), 639-43

Vereshchagina N, Bennett D, Szöör B, Kirchner J, Gross S, Vissi E, White-Cooper H, Alpey L. (2004) The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol Biol. Cell.* 15, 4395-4405

Walker KS, Watt PW, Cohen P. (2000) Phosphorylation of the skeletal muscle glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1 in response to adrenaline in vivo. *FEBS Lett.* 466 (1), 121-124

Walsh C. (2006) Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory. Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers. XXI, 490 pp

Wang H, Brautigam DL. (2002) A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem.* 277, 49605-12

Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massagué J, Shi Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*. 287(5450), 92-7

Yaffe MB. (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3, 177-86

Zimmerman, UJ, Boring, L, Pak JH, Mukerjee N, Wang KK. (2000) The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB*. 1, 63-68

Zinke I, Schutz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. (2002) Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*. 21, 6162-6173

## 11. Elektronikus hivatkozások

Utolsó sikeres elérés dátuma az értekezésben található összes elektronikus hivatkozás esetében: 2015.06.16.

Felhasznált adatbázisok listája:

Poszttranszlációs módosítások. Adatbázis: Pierce, Life Technologies

URL: <http://www.piercenet.com/method/overview-post-translational-modification>

Drosophila adatbázis: Flybase (A Database of Drosophila Genes & Genomes)

URL: <http://flybase.org/>

Drosophila Stock center: VDRC (Vienna Drosophila Resource Center)

URL: <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>

Primer tervező program: Oligo Explorer Software

URL: <http://oligo-explorer.software.informer.com/>

NCBI adatbázis: NCBI (National Center for Biotechnology Information)

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ClustalW szekvencia összehasonlító program. Adatbázis: EMBL (European Molecular Biology Laboratory)

URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Fehérje szerkezet jósló program: Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins

URL: <http://anchor.enzim.hu/>

Nukleotid-fehérje szekvencia átfordító program. Adatbázis: ExpASy

URL: <http://web.expasy.org/translate/>

Drosophila expressziós adatbázis: Flyexpress (Database for Expression Pattern of Drosophila genes)

URL: <http://www.flyexpress.net/>

Drosophila Stock center: Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University

URL: <http://flystocks.bio.indiana.edu/bloomhome.htm>

## 12. Tárgyszavak

*Drosophila melanogaster*

Protein foszfatáz 1

Glikogén anyagcsere

Gbs-70E

Élettartam, termékenység

*Drosophila melanogaster*

Protein phosphatase 1

Glycogen metabolism

Gbs-70E

Lifespan, fertility

## 13. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Dombrádi Viktornak, az Orvosi Vegytani Intézet egyetemi tanárának a szakmai és gyakorlati segítségért és támogatásért, amellyel munkámat figyelemmel kísérte és irányította.

Köszönöm Dr. Kókai Endrének, korábbi témavezetőmnek a bevezetést a kutató munkába, és a témát megalapozó kísérletek elvégzését. Neki és Dr. Farkas Ilonának külön köszönettel tartozom a gyakorlati feladatok elvégzésében nyújtott segítségért, a szakmai tanácsokért valamint a munkám során használt antitestek előállításáért.

Köszönöm Dr. Virág László egyetemi tanárnak, Intézetünk igazgatójának, és Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, az Orvosi Vegytani Intézet korábbi igazgatójának, hogy munkámat lehetővé tették az intézetben.

Köszönetet mondok az Orvosi Vegytani Intézet minden munkatársának, különösen laboratóriumunk dolgozóinak, Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztenseknek a gyakorlati feladatok kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Erdődi Ferencnek és Dr. Kiss Andreának a foszfoszubsztrátokért.

Köszönöm Dr. Csontos Csillának és Dr. Boratkó Anitának, hogy az általuk előállított rekombináns GST/TIMAP fehérjét rendelkezésemre bocsájtották.

Köszönettel tartozom Dr. Miskei Mártonnak a filogenetikai analízis elvégzéséért.

Köszönöm Dr. Daimark Bennettnak a PP1 izoformákat tartalmazó vektorokat.

Köszönettel tartozom az MTA-SZBK Genetikai és Biokémiai Intézet munkatársainak a hatékony együttműködésért; Dr. Deák Péternek és Dr. Andó Istvánnak a munkám során használt *Drosophila* kontrol és driver törzsekért, valamint Dr. Gausz Jánosnak és Dr. Páldy Ferencnek a deléciós mutáns *Drosophila* törzsek létrehozásáért.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátomnak, hogy munkámban támogattak és stabil hátteret biztosítottak.



## 14. Publikációs jegyzék



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



Nyilvántartási szám: DEENK/11/2015. PL  
Tételszám:  
Tárgy: Publikációs Lista

Jelölt: Kerekes Éva  
Neptun kód: ULRWZH  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
Mtm azonosító: 10036936

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kerekes, É.**, Kókai, E., Páldy, F.S., Dombrádi, V.: Functional analysis of the glycogen binding subunit CG9238/Gbs-70E of protein phosphatase 1 in *Drosophila melanogaster*.  
*Insect Biochem. Mol. Biol.* 49, 70-79, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.002>  
IF:3.42 (2013)
2. Kókai, E., Páldy, F.S., Somogyi, K., Chougule, A., Pál, M., **Kerekes, É.**, Deák, P., Friedrich, P., Dombrádi, V., Ádám, G.: CalpB modulates border cell migration in *Drosophila* egg chambers.  
*BMC Dev. Biol.* 12 (1), 1-26, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213X-12-20>  
IF:2.728

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora: 6,148

A közzétett folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
6,148

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.01.19.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) □ Honlap: [lib.unideb.hu](http://lib.unideb.hu)

## **Az értekezéshez kapcsolódó poszterek**

Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferencz Páldy, János Gausz, Péter Friedrich, Viktor Dombrádi: Searching for the function(s) of the CG9238 gene in *Drosophila*. Europhosphatase 2013: Protein Phosphatases in Health and Disease, Rehovot, Israel. 2013.

Kerekes Éva, Pop Ferenc, Ádám Géza, Gausz János, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor, Kókai Endre: A *Drosophila* CG9238 gén funkcionális vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése, Pécs. 2011. Biokémia, XXXV/3, 34.

Kerekes Éva, Pop Ferenc, Ádám Géza, Gausz János, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor, Kókai Endre: A *Drosophila* CG9238 gén funkcionális vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest. 2010. Biokémia, XXXIV/3, 36.

## **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferencz Páldy, Viktor Dombrádi: Functional analysis of the glycogen binding subunit CG9238/Gbs-70E of protein phosphatase 1 in *Drosophila melanogaster*. Signaling pathways in cancer biology, Mátraháza. 2014.

Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferencz Páldy, Viktor Dombrádi: Investigation of the human R5 homolog *Drosophila* CG9238. Signaling pathways in cancer biology, Egerszalók. 2013.

Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferencz Páldy, Viktor Dombrádi: Searching for the function(s) of the CG9238 gene in *Drosophila*. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen. 2012. és Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen. 2013.

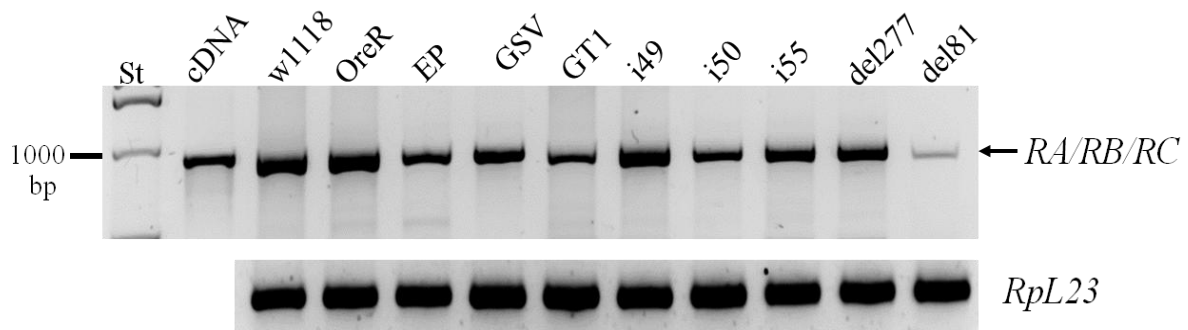
Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferencz Páldy, Viktor Dombrádi: Characterization of R5 glycogen binding subunit homolog in *Drosophila*. Signal transduction and skin biology: a training course, Galyatető. 2010. és Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen. 2011.

Kókai Endre, Kerekes Éva, Pop Ferenc, Ádám Géza, Gausz János, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor: A *Drosophila* protein foszfatáz 1 enzimmel kölcsönható CG9238 géntermék funkciójának vizsgálata. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza. 2009.

## 15. Függelék

### *Gbs-70E* expresszió vizsgálata kvalitatív RT-PCR reakcióval, *Gbs-70E3-6* primerekkel

A kvalitatív PCR során a *Gbs-70E3-6* primerekkel (lásd: 4. táblázat) vizsgáltuk a törzsek *Gbs-70E* expresszióját *RpL23* háztartási gén kontroll mellett. A primerek bekötődési helyei a 19. ábrán látható módon a 3. és a 6. exonon vannak, így a primerpár mindhárom transzkriptumot képes felismerni, róluk a RT-PCR reakció során 994 bp termék jön létre.



Pozitív kontroll RE56341 cDNS; w1118 és OreR: kontroll törzsek; EP, GSV és GT1: P-elem inzerció törzsek; i49, i50, i55: *Gbs-70E* RNS interferencia szülői törzsek, del277 és del81: deléciós mutánsok. PCR termékek futtatása 1 % agaróz gélen történt. St: Invitrogen 1000 bp standard. Háztartási kontroll gén: *RpL23*.