

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

## Fehérje módosító enzimek vizsgálata *Drosophila* fajokban

Kerekes Éva

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
Debrecen, 2015

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kerekes Éva okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Buday László, akadémikus  
Dr. Balogh István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK  
Élettani Intézet Könyvtára  
2015. október 22. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Bodai László, PhD

Dr. Penyige András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Buday László, akadémikus  
Dr. Bodai László, PhD  
Dr. Balogh István, PhD  
Dr. Penyige András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2015. október 22. 13:00

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. Fehérjék poszttranszlációs módosítása

A sejtekben létrejött fehérjék nagy része transzláció után kémiai modifikáción esik át, amit poszttranszlációs módosításnak (PTM) nevezünk. A PTM segíti a fehérjéket funkciójuk elnyeréséhez, kölcsönhatásaik kialakításához és működési helyük eléréséhez. A poszttranszlációs módosítások révén az eukarióta sejtek genomjában kódolt gének számához képest a funkcionálisan különböző fehérjék száma nagyságrendekkel nagyobb. A PTM lehet reverzibilis vagy irreverzibilis, attól függően, hogy a módosítás visszafordítható-e. Reverzibilis módosításra jó példa a foszforiláció, míg gyakori irreverzibilis modifikáció a proteolízis.

## 1.2. Fehérje foszforiláció-defoszforiláció

A foszforiláció során az ATP molekula gamma foszfátcsoportja kapcsolódik a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncaira. A szerin vagy treonin oldalláncokra kerül a foszforilációval átvitt foszfátcsoportok körülbelül 99 %-a, a maradék a tirozinra. A folyamatot a protein kináz enzimek katalizálják, az ellentétes reakciót, a foszforilációs mechanizmust reverzibilissé tevő defoszforilációt pedig a foszfatáz enzimek segítik elő. Az eukarióta fehérjék egyharmad része foszforilálható, ami mutatja a poszttranszlációs mechanizmus élettani jelentőségét. A foszforilációnak szerepe van többek között a sejtciklusnak, az apoptózisnak, a jelátviteli folyamatoknak, a sejtek energia metabolismusának vagy differenciációjának szabályozásában.

### 1.2.1. A protein foszfatázok

A foszfoprotein foszfatázok (PPP) a szerin/treonin specifikus csoport nagy jelentőségű tagjai, az eukarióta sejtekben mérhető foszfatáz-aktivitás jelentős hányadát adják. Ebbe az enzimesaládba tartoznak a klasszikus PP1, PP2A, PP2B valamint az új típusú PP4, PP5, PP6 és PP7 foszfatázok. A csoport egyes tagjainak elkülönítése

speciális gátlószerek révén lehetséges, például a PP1 gátlószere az Inhibitor 1 és 2 fehérjék, a PP2A pedig okadainsavval gátolható. A PP1 katalitikus alegysége (PP1c) egy 35 kDa méretű fehérje. Központi része erősen konzervált, a C-és N-terminális végei sokkal változatosabbak. Számos regulátor alegység kapcsolódhat a PP1c-hez, sokféle holoenzimet alkotva. A regulátor alegységek meghatározzák a szubsztrát specificitást, a megfelelő sejtkompartmenthez irányítják az enzimet, valamint más kölcsönható partnerekhez kapcsolhatják a holoenzimet. A számos regulátor alegység közül a humán  $G_M$  és  $G_L$  alegységek a PP1 glikogénkötő alegységei, amelyek a foszfatázt a poliszacharidhoz irányítják.

### **1.2.2. A protein foszfatáz 1 szerepe a glikogén anyagcserében**

A PP1 szabályozó szerepe a glikogén anyagcserében már régóta ismert. A glikogén szintézis és lebontás folyamatának enzimei foszforilációval regulálhatók, defoszforilációjukat a PP1 holoenzim formájában végzi. A holoenzimet alkotó regulátor alegységek jellemzője, hogy képesek a PP1c-hez és a glikogénhez, illetve egyéb kölcsönható fehérjékhez kapcsolódni. A humán glikogénkötő PP1c interakciós partnerek a PPP1R3 (GM), a PPP1R3B (GL), az R5 és R6 fehérjék. A PP1c-hez kapcsolódva a glikogén foszforiláz és glikogén szintetáz enzimeket defoszforilálva a glikogén szintézisét segítik elő, miközben a glikogén lebontását gátolják.

### **1.3. A glikogén anyagcsere regulációja *Drosophila melanogaster*-ben**

A *Drosophila* glikogén anyagcsere és szabályozása hasonló a humán glikogén metabolizmushoz. A folyamat enzimeit, a glikogén foszforiláz és szintetáz enzimeket ugyanúgy a PP1 defoszforilálja. A *D. melanogaster* PP1c-nek négy izoformája van, ezek a PP1-87B, a PP1-13C, a PP1-96A és a PP1-9C. Az egyes izoformák szerepe a glikogén anyagcserében még nem tisztázott. A legjelentősebb izoformának, a PP1-87B-nek kiütése letális, ami lehetetlenné teszi a glikogén anyagcserében szerepének vizsgálatát a nullmutánsban. Így a foszfatázok szerepének feltárására célszerű megközelítést jelent a glikogénkötő alegységek tanulmányozása.

A *Drosophila* glikogén anyagcserében részt vevő PP1c regulátor alegységeket ezidáig nem jellemezték. Szekvenca homológia alapján két *Drosophila* fehérje tekinthető a humán glikogénkötő alegységek homológjának, a CG9238/Gbs-70E és a CG9619/Gbs-76A. Mindkét fehérje konzervált glikogénkötő és PP1c-kötő doménnel rendelkezik. A Gbs-76A-ról ismert, hogy az összes PP1c izoformával kapcsolatba léphet, a Gbs-70E-ről pedig leírták, hogy a PP1-87B és a PP1-96A izoformákkal képes kölcsönhatni. A glikogénhez való kötődésük és a PP1c aktivitására gyakorolt hatásuk azonban nem volt tisztázott. A két gén közül az eddig ismert irodalmi adatok alapján fontosabbnak tűnő Gbs-70E részletes vizsgálatával és jellemzésével foglalkoztunk.

#### **1.4. A fehérjék proteolízise**

A proteolízis irreverzibilis poszttranszlációs módosítás, amely során a fehérjéket felépítő aminosavak közötti peptidkötések hasadnak fel. A reakciót végző enzimek a proteázok. A proteázok az aktív helyen lévő csoportjuk alapján lehetnek metallo-, szerin, aszpartil vagy cisztein proteázok. A proteolízis szerepet játszik például a vérárvadás, a peptid hormonok és emésztőenzimek aktiválása, vagy az extracelluláris mátrix átrendeződése során. A kalpainok kalcium függő cisztein proteázok, a legtöbb élőlényben és szövettípusban megtalálhatók. Szerepüket leírták például a mioblasztok sejtfúziója, a sejtek migrációja vagy a vérerek keresztmetszetének szabályozása kapcsán. A humán genomban 16 kalpain gén található. A CAPNS1 és a CAPN2 kiütése embrionális letálist eredményez. *D. melanogasterben* négyféle kalpain ismert (*CalpA*, *CalpB*, *CalpC*, *CalpD*). Funkcionálisan az A és B forma jelentős, amik a humán CAPN2-re hasonlítanak. Korábbi munkánk során elvégeztük a *CalpA* és *CalpB* funkcionális vizsgálatát. A kalpainok vizsgálatára kidolgozott módszertani megközelítést alkalmaztuk a PP1 feltételezett glikogénkötő alegységének jellemzésére is *Drosophila melanogasterben*.

## 2. 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.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. *Drosophila* törzsek

Vizsgálatainkhoz  $w^{1118}$  illetve Ore-R kontroll törzseket, P-elem inzerációs törzseket, együttműködő partnereink által genetikai módszerekkel létrehozott deléciós mutánsokat, valamint RNS interferencia segítségével előállított *Drosophila melanogaster* törzseket használtunk. Az RNS interferenciát driver törzsekkel való keresztezéssel indukáltuk. A Gbs-70E ortológjainak vizsgálataihoz *Drosophila eugracilis*, *yakuba*, *virilis*, *willistoni* és *biarmipes* törzseket használtunk.

#### 3.2. Nukleinsav vizsgáló módszerek

Genomi DNS-t fenol-kloroformos módszerrel izoláltunk. Teljes RNS izolálását TRIzol reagens segítségével végeztük, a DNS szennyezést DNáz enzimmel távolítottuk el. cDNS szintézise reverz transzkriptáz enzim és oligo(dT) felhasználásával történt. A PCR reakciókat Taq DNS polimeráz felhasználásával végeztük, majd a PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk.

#### 3.3. Fehérje expresszió

A Gbs-70E RA cDNS-ét pGEX-5x-1 illetve pET-28a plazmidokba klónoztuk. A klónokat kompetens DH5 $\alpha$  *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, majd ezekből plazmidot preparáltunk, amelyet restrikciós analízissel és szekvenálással ellenőriztünk. A kiválasztott konstruktot BLR *E. coli* törzsbe transzformáltuk. Az expresszióhoz éjszakai tenyészetet készítettünk. Másnap nagy mennyiségű tápfolyadékban folytattuk tovább a sejtek növesztését, és indukáltuk a fehérje expresszióját. A sejteket centrifugáltuk és affinitás kromatográfiával tisztítottuk a rekombináns fúziós fehérjéket.

### 3.4. Immunológiai módszerek

*Antitestek előállítása:* Az  $\alpha$ -GST és  $\alpha$ -Gbs-70E antitesteket együttműködő partnereink állították elő. Az  $\alpha$ -Gbs-70E antitest létrehozásához a 6xHis/Gbs-70E rekombináns fehérjét nyulakba injektáltuk. Az antiszérumot a nyulak véréből állítottuk elő, és működését rekombináns fehérjével ellenőriztük dot blot és Western blot módszerekkel.

*Western blot:* A fehérjemintákat SDS poliakrilamid gélen futtattuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A membránokat blokkoltuk, majd egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestekkel. Másnap mostuk, majd szobahőn ráztuk a membránokat a másodlagos antitesttel, majd újra mostuk. A fehérjéket kemilumineszcens reagenssel tettük láthatóvá.

*Pull down:* *D. melanogaster* embrió kivonatot készítettünk, a lizátumot jégen szonikáltuk, majd centrifugáltuk, és a pelletet eldobtuk. Eközben rekombináns 6xHis/Gbs-70E fehérjét Ni-agaróz gyantával és pufferrel inkubáltunk, majd centrifugáltuk. Ezután a Ni-agaróz gyantára kikötött rekombináns fehérjét embrió lizátummal inkubáltuk, majd centrifugáltuk. Negatív kontrollként üres Ni-agaróz gyantát használtunk. Az összegyűjtött gyantát mostuk, majd a mintákat Western blottal  $\alpha$ -PP1c antitesttel vizsgáltuk.

*Immunprecipitáció:* Az embriómintát homogenizáltuk, szonikáltuk majd centrifugálással tisztítottuk. A pelletet eldobtuk, a felülúszót Protein-A-agarózon előtisztítottuk, majd centrifugálással összegyűjtöttük a gyantát. Eközben Gbs-70E antitestet kötöttünk ki Protein-A-agarózra. Lizispufferrel mostuk a mintát, majd centrifugáltuk. Az előtisztított lizátumot és a gyantát, amelyre Gbs-70E antitestet kötöttünk, forgatással inkubáltuk. Másnap a mintát centrifugáltuk, majd az összegyűjtött gyantát mostuk. A mintákat Western blottal  $\alpha$ -PP1 $\beta$  antitesttel vizsgáltuk.



### 3.5. Biokémiai analízis

*Szedimentációs vizsgálat:* Glikogént inkubáltunk GST/Gbs-70E rekombináns fehérjével, majd szacharóz oldatra rétegeztük. A mintát ultracentrifugálással választottuk szét pellet és felülúszó részre. Negatív kontrollként GST/TIMAP rekombináns fehérjét használtunk. A felülúszókból és pelletből vett mintákat Western blotlalt  $\alpha$ -GST antitesttel vizsgáltuk.

*Foszfataáz aktivitásmérés:* Tisztított nyúl vázizom PP1 aktivitását  $^{32}$ P-foszforiláz vagy  $^{32}$ P-miozin könnyű lánc szubsztrátokkal határoztuk meg, rekombináns GST/Gbs-70E fehérje jelenlétében vagy hiányában.

*A fehérjetartalom mérése* Bradford szerint, BSA referencia oldattal történt. *A glikogéntartalom meghatározását* fenol-kénsavas méréssel végeztük.

### 3.6. Biológiai vizsgálatok

*Élesztő kéthibrid kísérlet:* A csali elkészítéséhez pGBKT7 vektorba klónoztuk a *Gbs-70E RA* cDNS-ét. A *Drosophila* PP1c izoformáinak cDNS-ét tartalmazó pACT vektorban lévő konstruktokat Dainmark Bennettől kaptuk. A csalivektort a PP1c cDNS-eket tartalmazó konstruktokkal kotranszformáltuk élesztősejtekbe, majd szintetikus táptalajon növesztettük. A kísérlethez negatív kontrollként PPY-pGBKT7 és MYPT-75D-pACT konstruktokat kotranszformáltunk, míg pozitív kontrollként a PPYR1-pGADT7 és PPY-pGBKT7 konstruktokat.

*Élethossz meghatározás:* a *Drosophila* törzseket 20 darab *Drosophila*/cső sűrűséggel tartottuk fenn. Hetente háromszor ráztuk át őket friss táptalajra, amikor a döglött állatok számát feljegyeztük addig, amíg mindegyik el nem pusztult.

*Termékenység vizsgálat:* fekete táptalajon tartottunk genotípusonként nőstényeket és hímeket állandó páratartalom mellett, majd 4 nap múlva megszámoltuk a petéket.

*Életképességi vizsgálat:* petéket helyeztünk ki általános muslica táptalajra, majd a kikelt felnőtt muslicákat megszámoltuk.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### 4.1. A *Drosophila* protein foszfatáz 1 Gbs-70E glikogénkötő alegységének biokémiai vizsgálata

A *Drosophila* genomban szekvencia homológia alapján azonosítottunk két lehetséges glikogénkötő PP1 alegységet, ezeknek a jelölése *CG9238/Gbs-70E* és *CG9619/Gbs-76A*. A fehérjék aminosav szekvenciáit összehasonlítva a humán és *C. elegans* glikogénkötő alegységekkel azt tapasztaltuk, hogy a fehérjék központi, erősen konzervált régiójában, a foszfatáz kötő motívumban és a glikogénkötő doménben igen nagy a hasonlóság. További irodalmi adatok alapján arra következtettünk, hogy a domináns izoforma a Gbs-70E, ezért kutatásunk célpontjául ezt választottuk. Ismert volt az is, hogy a *Gbs-70E* génről 3 mRNS (a legrövidebb az *RA*, a két hosszabb az *RB* és *RC* transzkriptumok) és 2 féle, egy rövidebb (PA) és egy hosszabb (PB/PC) fehérje képződhet. A központi konzervált részek: a glikogén- és foszfatázkötő elemek mindkét izoformában megtalálhatóak.

Munkánk első felében kísérletesen bizonyítottuk, hogy a Gbs-70E konzerválódott fehérjerészleteinek, a foszfatázkötő motívumnak és a glikogénkötő doménnek a funkciói megőrződtek. A leírt két PP1c izoforma mellett élesztő kéthibrid kísérlettel kapott eredményeink szerint a Gbs-70E a másik két *Drosophila* PP1c-vel is képes kölcsönhatni. Eredményeinket két független kísérlettel, immunprecipitációval és pull down módszerekkel is alátámasztottuk. Habár a foszfatáz kötő motívumban egy aminosav csere van, a *Drosophila* Gbs-70E a PP1 alegységének tekinthető. Ezen kívül szedimentációs kísérletünkkel igazoltuk a Gbs-70E és a glikogén *in vitro* kölcsönhatását is, tehát a fehérje valóban a *Drosophila* PP1c glikogénkötő alegysége.

A Gbs-70E foszfatáz aktivitásra kifejtett hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns Gbs-70E kis mértékben csökkenti a PP1c foszfatáz aktivitását mind a foszforiláz-a, mind a miozin könnyű lánc szubsztráttal szemben. A szubsztrátspecifitás hiánya arra utalhat, hogy a Gbs-70E egy olyan ősi PP1c regulátor

alegység, amely fiziológias körülmények között nem befolyásolja jelentősen az enzimaktivitást, feladata a PP1 és a glikogén, illetve kölcsönhatóinak térbeli közelségbe hozása. A nagyszámú kölcsönható partner miatt a Gbs-70E hálózatképző fehérjeként működhet. A kölcsönhatások kialakításának lehetőségét alátámasztja a Gbs-70E fehérje N-terminális részen található rendezetlen szerkezetű szakasz, amely több fehérje kötőhelyet is tartalmazhat.

#### **4.2. A *Gbs-70E* gén expressziójának vizsgálata**

A *Gbs-70E* expressziós mintázatát RT-PCR kísérlettel határoztuk meg a *D. melanogaster* törzsben. Eredményeink szerint a hosszabb *RB/RC* mRNS-ek minden fejlődési stádiumban és nemben expresszálódnak, a rövidebb *RA* csak az embriókban és a nőstények ováriumában fejeződik ki. Eredményeink összhangban vannak a Flybase adatbázis *Gbs-70E* génre vonatkozó DNS chip, RNS szekvenálás, *in situ* hibridizáció és EST adataival. Ez alapján arra következtettünk, hogy az *RA* mRNS és így a PA fehérje izoforma anyai eredetű, és az embrionális fejlődésben lehet szerepe.

A *Gbs-70E* ortológok fehérjeszekvenciáinak elemzésével megállapítottuk, hogy ezen fehérjék evolúciós változása tükrözi a fajok evolúciós viszonyait. Ezután a *Gbs-70E* ortológok transzriptjeinek elemzésével a *D. melanogaster*-nél megfigyelt szexspecifikus expresszió konzerválódását vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy csak a *D. melanogaster*-hez evolúciósan közeli fajok expressziós mintázata hasonló, azonban az rövid variáns megjelenése evolúciósan nem konzerválódott. Tehát a rövidebb *Gbs-70E RA* variáns különleges szerepére vonatkozó feltevésünket a kísérletek nem támasztották alá.

### 4.3. A *Drosophila* Gbs-70E funkcionális vizsgálata

Korábbi munkánk során, *Drosophila* kalpainok funkcionális vizsgálatára kidolgoztunk egy kutatási stratégiát, amit a Gbs-70E foszfatáz alegység tanulmányozásában is felhasználtunk. Mindkét, hazai együttműködésben végzett munkánk során molekuláris genetikai módszerekkel csökkentett génexpressziójú *D. melanogaster* törzseket hoztunk létre, és ezeket felhasználva vizsgáltuk a deletált gén funkcióját. Kísérleteinkben egy GT1 és egy EP jelű inzerációs törzset használtunk. Az EP inzerációs törzs segítségével deléciós mutánsokat (del81 és del277) hoztunk létre. A törzsek expressziós szintjét RT-PCR-rel határoztuk meg, és azt tapasztaltuk, hogy az inzerciók már magukban is érintik a *Gbs-70E* gén expresszióját, viszont a deléciók hatása sokkal jelentősebbnek bizonyult: a del81 deléciós mutáns nullmutánsnak tekinthető. A géndeláció egyik esetben sem okozott letalitást, tehát a *Gbs-70E* nem esszenciális. Feltételeztük, hogy a Gbs-70E szerepet játszik a raktározott glikogén szintjének kialakításában. Ezzel összhangban a legalacsonyabb Gbs-70E expressziós szintet mutató del81 mutánsban jelentősen kevesebb glikogén található. Ezzel bizonyítottuk, hogy a Gbs-70E egy funkcionális glikogénköltő PP1 alegységnek tekinthető.

Emellett bizonyítottuk, hogy a Gbs-70E befolyásolja a *Drosophila* élettartamát is. RNS interferencia törzsek felhasználásával igazoltuk a Gbs-70E az irodalomban már leírt életképesség növelő hatását. RNS interferenciával a *Gbs-70E* expresszió kismértékben csökkenthető. Az élethossz megnövekedését a glikogén metabolizmus lassulásán keresztül a metabolikus terhelés csökkenése okozhatja. A *Gbs-70E* expresszió nagymértékű csökkenése a del81 deléciós mutáns esetében viszont az élettartam szignifikáns csökkenését okozta. Az RNS interferencia kisebb hatékonysága miatt az eredmények csak a génexpresszió kis csökkenésének következményeit mutatják és a *Gbs-70E* gén funkcióját illetően félrevezetőnek bizonyultak.

A génexpresszió vizsgálata alapján feltételeztük, hogy a Gbs-70E szerepet játszhat az embriogenezisben. A nőstények termékenységének összehasonlítása során jelentős csökkenést tapasztaltunk a del81deléciós törzs nőstényei által lerakott peték számában igazolva azt, hogy a Gbs-70E szerepet játszhat az embrionális fejlődés korai szakaszában.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *D. melanogaster* PP1 Gbs-70E glikogénkötő alegysége a szerkezeti és biokémiai tulajdonságai alapján a humán G<sub>M</sub> és G<sub>L</sub> alegységekhez kevésbé hasonlító, ősi PP1 regulátor fehérjének tekinthető, ami szerepét hálózatképző tulajdonsága révén, kölcsönható partnereivel kölcsönhatásban töltheti be. A *Gbs-70E* gén deléciója nem okoz letalitást, ezért szerepe nem létfontosságú. Kimutattuk, hogy a Gbs-70E a *Drosophila* glikogén metabolizmusban játszik szerepet, és ezen kívül az élettartam meghatározásában, és az embriogenezisben is szerepet tölt be.

Ha összehasonlítjuk a fenti eredményeket a korábbi, *Drosophila* kalpainok funkcionális vizsgálatára irányuló vizsgálatokkal, számos hasonlóságot találhatunk. Mindkét esetben azonos kísérleti megközelítést alkalmaztunk: együttműködő partnereinkkel csökkentett génexpressziójú törzseket hoztunk létre és a mutánsok funkcionális vizsgálatával 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 homológ humán gének számához viszonyítva kevesebb volt a *Drosophila* ortológok száma: a kalpain esetében 4 *Drosophila* és 16 humán, míg a glikogénkötő 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. A *Drosophila* glikogénkötő PP1 alegység vizsgálatával azt bizonyítottuk, hogy a Gbs-70E szabályozza a glikogéntartalmat.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

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 fiziológias 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 nőtények ováriumában mutatható ki, ami anyai hatásra és az embriogenezisben játszott szerepre utal. Molekuláris genetikai kísérletekben a gén deléciónál megállapítottuk, hogy az *Gbs-70E* expressziós szintjének drasztikus csökkentése a glikogén szint és az élettartam szignifikáns csökkenését eredményezi és csökkenti a nőtények 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.



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 közlő folyóiratok összesített impakt faktora: **6,148**

A közlő 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.



## Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

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

Éva Kerekes, Endre Kókai, Ferenc 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, Ferenc 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 kölesönható CG9238 géntermék funkciójának vizsgálata. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus és XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza. 2009.