

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Kókai Endre

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet
2006**

Témavezető:

Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

A Szigorlati Bizottság elnöke:

Dr. Damjanovich Sándor akadémikus, az MTA rendes tagja

A Szigorlati Bizottság tagjai:

Dr. Nyitray László, Ph.D.

Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A Védési Bizottság elnöke:

Dr. Damjanovich Sándor akadémikus, az MTA rendes tagja

Opponensek:

Dr. Bíró Sándor, Ph.D.

Dr. Buday László, az MTA doktora

A Védési Bizottság tagjai:

Dr. Nyitray László, Ph.D.

Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

1. BEVEZETÉS

Fehérje foszforiláció-defoszforiláció

A fehérjék foszforilációja az evolúció korai szakaszában kialakult kovalens módosítás. Az utóbbi évek kutatási eredményei számos példát szolgáltatnak a foszforiláció jelentőségére prokariotákban. A folyamat evolúciós sikerességét mutatja, hogy a foszforilációért felelős protein kinázok minden eukarióta élőlényben megtalálhatóak és szerkezetük egyetlen ősi enzimre vezethető vissza. A negatív töltésű foszfátcsoport hozzákapcsolódása a szerin, treonin ill. tirozin aminosav-oldalláncokhoz megváltoztatja a töltéseloszlást, amely következtében a fehérje szerkezete is megváltozik. A foszfátcsoport stabilizálhatja a fehérje szerkezetét, növelheti a tápértékét, szabályozó szerepet tölthet be, de előfordulhat, hogy nincs hatása, illetve a módosítás fiziológiai szerepe nem ismert.

A foszforiláció mint regulációs lehetőség csak akkor válhatott hatékonnyá, amikor lehetővé vált reverzibilis működése, azaz lejátszódott a fehérje defoszforilációja. A protein Ser/Thr kinázok mellett szükség volt tehát a foszfátcsoportot hidrolízissel eltávolítani képes enzimre, a protein foszfatázokra. Az ellentétesen ható kinázok és foszfatázok egyenértékűen fontos elemei a szabályozó rendszereknek. A protein foszfatáz enzimeket szubsztrátspecifitásuk, katalitikus alegységük szerkezete és a katalizált reakció mechanizmusa alapján az ún. foszfoprotein foszfatáz (PPP), fémionfüggő protein foszfatáz (PPM), ill. az RNS polimeráz II C-terminális doménjére specifikus protein foszfatáz (FCP) csoportba sorolhatjuk. A fehérjék Tyr oldalláncát a protein tirozin foszfatáz (PTP) család tagjai defoszforilálják, amelyek egy aktív cisztein oldalláncot használnak a szubsztrát foszfátjának lehasítására, cisztein-foszfat közütermék képződése közben. Azonos reakciómechanizmus szerint működnek az ún. kettős vagy széles specifitású protein foszfatázok (DSP), amelyek egyaránt képesek defoszforilálni a fehérjék szerin, treonin és tirozin oldalláncait.

A foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimcsalád

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok közé tartozó PPP enzimcsalád tagjai már megtalálhatóak az ősi archea baktériumokban is, de itt nem töltenek be esszenciális funkciót. Az eukarióta élőlényekben a PPP család számos tagja van jelen, a sejtekből készített kivonatokban mérhető protein foszfatáz enzimaktivitásért, döntően három PPP enzim felelős, a protein foszfatáz 1, 2A és 2B (PP1, PP2A, PP2B). A PP1 és a PP2A esszenciális feladatokat lát el az eukarióta sejtek életműködésében, a PP2B, vagy más néven kalcineurin gátlása nem vezet letalitáshoz, azonban ez is fontos szabályozó szereppel rendelkezik. A család többi tagjának aktivitását nehezen lehet detektálni a hagyományos biokémiai

módszerekkel. Kimutatásukat csak a molekuláris klónozás módszere tette lehetővé, ezért ezeket „új típusú” protein foszfatázoknak nevezzük. Szerkezetük alapján átmenetet mutatnak a klasszikus PP1, PP2A és PP2B protein foszfatázok között. Mindazokat az új típusú protein foszfatázokat, amelyek rendelkeznek a megfelelő humán homológgal, számozással jelölték. Ezek a PP4, PP5, PP6 és PP7 jelölést kapták. A humán homológgal nem rendelkező enzimek a számok helyett nagybetűs jelölést kaptak. A *Drosophila*-ban két ilyen protein foszfatáz van, amelyek a PPY ill. a PPN elnevezést kapták. Evolúciós szempontból különlegesen érdekesek azok az új típusú protein foszfatázok, amelyek az élőlények egy szűk csoportjában találhatóak meg és viszonylag későn különültek el a klasszikus foszfatázoktól. Ezért vizsgálataink a *Drosophila* PPY és PPN enzimekre irányultak.

A *Drosophila* PPP enzimcsalád

A szerkezeti hasonlóságon alapuló könyvtárszűrések és PCR reakciók, valamint a klasszikus genetika módszereinek felhasználásával az ecetmuslicában található PPP enzimcsalád számos tagját leírták, még mielőtt a *Drosophila* genom program befejeződött volna. A *Drosophila* genom program lehetőséget biztosított a korábban még nem azonosított protein foszfatáz katalitikus alegységek megtalálására. A *Drosophila melanogaster*-ben összesen 19 PPP foszfatáz katalitikus alegységet kódoló gén van. Ezek között megtaláljuk a klasszikus PP1, PP2A (mts) és PP2B (CanA) protein foszfatázokat, az új típusú PP4, PP5 (PpD3), PP6 (PPV), PP7 (rdgC), PPN, PPY, PpD5 és PpD6 foszfatázokat, valamint az Y kromoszómán elhelyezkedő két protein foszfatázt. Ezen enzimek funkciójára vonatkozóan csak néhány esetben áll rendelkezésünkre genetikai információ. A *Drosophila* protein foszfatáz Y és N funkciójára utaló mutáns még nem sikerült azonosítani, így csak közvetett bizonyítékaink vannak lehetséges fiziológiai szerepükről.

Drosophila specifikus protein foszfatázok

A PPY és PPN cDNS-ek klónozását követően a gének lokalizációját a PPY esetében az 55A, a PPN-nét pedig az 58A régióban, a második kromoszóma jobb karján határozták meg. Mind a két gén terméke szerkezeti hasonlóságot mutat a PP1 katalitikus alegységével. A genomi szekvencia megismerése után kiderült, hogy a gének kódoló régiója nem tartalmaz intront, és a teljes *Drosophila* genomban csak egy-egy ilyen gén található (azaz a PPY-nak és a PPN-nek nincsenek izoformái). A génextpresszió mRNS szintű vizsgálata azt mutatta, hogy mind a két transzkript az egyedfejlődés során először a lárvastádiumban jelenik meg, majd kimutatható a bábban és a kifejlett hím egyedekben. Feltételezhető, hogy a lárvá és a bábállapotban is csak a hímekben fordul elő. A szövetspecifitási

vizsgálatok azt igazolták, hogy a PPY és a PPN mRNS a kifejlett hím egyedek heréjében lokalizálódik. Ezt a megfigyelést a PPY esetében a fehérjeszintű vizsgálatok is megerősítették. Immunhisztokémiai módszerekkel azt is megállapították, hogy a PPY fehérje a herében a cisztasejtek sejtmagjában akkumulálódik. Ezen eredmények alapján feltételezték a PPY spermafejlődésben betöltött szerepét. Azt, hogy a PPY valóban protein foszfatáz aktivitással rendelkezik, a rekombináns fehérje enzimaktivitásának mérésével bizonyították. A mérések szerint az enzim specifitását és okadainsav iránti érzékenységét illetően a PP1-hez hasonlít, azonban nem gátolható a protein foszfatáz hőstabil inhibitoraival, és ebből a szempontból inkább a PP2A biokémiai tulajdonságával mutat hasonlóságot. A PPN-nel szemben eddig még nem termeltek antitestet, így a fehérje előfordulására vonatkozó adatok is hiányoznak. Tekintettel arra, hogy mind a mai napig nem sikerült a klasszikus genetikai módszerekkel PPY illetve PPN mutánsokat előállítani, ezen foszfatázok fiziológiás szerepe továbbra is nyitott kérdés maradt.

A protein foszfatázok regulációja

A közelmúltban befejeződött genom programok azt igazolták, hogy a protein kinázok katalitikus alegységét kódoló gének száma jóval nagyobb, mint a protein foszfatáz gének száma. A humán genom program adatai alapján a szerin/treonin specifikus protein kinázok és protein foszfatázok aránya ~10:1 az emberben, míg a *Drosophila*-ban a genom program alapján ez az arány ~6:1. Felmerül a kérdés, hogyan képesek a protein foszfatázok egyenrangú partnerként együttműködni a nagyszámú protein kinázzal? A választ a PPP családba tartozó protein foszfatáz katalitikus alegységek azon tulajdonsága adja, hogy mindig regulátor vagy kölcsönható alegységgel alkotott holoenzim formában fordulnak elő az élő sejtekben. A PP1 esetében már több mint ötven kölcsönható fehérjét azonosítottak, amelyek többsége rendelkezik egy konzervált felismerő hellyel ami más kötőhelyekkel együtt felelős a stabil komplex kialakításáért. A PP2A katalitikus alegység általában dimert alkot az ún. A regulátor alegységgel, amelyet kivételes esetben más fehérje is helyettesíthet. Ehhez a többnyire állandó maghoz kapcsolódnak a változatos B alegységek (B', B'', B''') vagy egyéb más regulátor fehérjék. A PP2B katalitikus alegység szintén holoenzimet alkot egy regulátor B alegységgel, amely kalciumot képes megkötni. Az enzim teljes aktivitásához szükség van még a kalcium-kötő képességű kalmodulin kapcsolódására. A protein foszfatáz katalitikus alegységekkel kölcsönható fehérjék megváltoztatják az enzimek aktivitását, szubsztrátspecifitását és különböző sejt-kompartmentekhez irányítják az enzim aktivitást. A regulátor fehérjék így biztosítják a protein

foszfatázok számára az egymástól térben és időben is elkülönülő biokémiai folyamatokban való részvételt.

Új típusú protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék

Az új típusú protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék közül sokkal kevesebbet ismerünk. A PP4-nek három különböző regulátor alegysége van: az $\alpha 4$, immunglobulinreceptorhoz kapcsolódó fosztoprotein, a PP4_{RI}, 13 ismétlődő szekvenciariészletet tartalmazó fehérje, melynek szerkezete hasonló a PP2A A alegységéhez, és a PP4R2 centroszómákhoz kapcsolódó fehérje. Igazolták továbbá a PP4 kölcsönhatását a c-Rel, NF κ B p50, és RelA transzkripció faktorokkal, a Gemin3 és Gemin4 fehérjékkel, amelyek a motoros neuron túlélési komplex tagjai, valamint az inzulin receptor szubsztrát 4 fehérjével. A PP5 foszfatáz esetében ismerünk a legtöbb kölcsönható fehérjét. A tetra-rikozopeptid ismétlődést tartalmazó doménje kapcsolódni képes a Hsp90-glükokortikoid receptor heterokomplexhez, a kriptokrom 2-höz, az anafázis-promóter komplex CDC27 alegységéhez, az apoptózis szignál-regulált kináz 1-hez, a heterotrimer G protein Ga12 és Ga13 alegységéhez, a copine I, II és IV membránhoz kötődő fehérjékhez, az ellenőrzőpont ATM kinázhoz, valamint a DNS-függő protein kináz katalitikus alegységéhez. A SIT4/PP6 katalitikus alegység komplexet alkot a mitózis során a különböző molekulatömegű ún. SIT4-kötő fehérjékkel (SAP155, SAP185, SAP190). Kimutatták, hogy a Hal3 nevű fehérje és homológja, a Vhs3 gátló hatást fejt ki a Ppz1 gombaszpecifikus új típusú protein foszfatáz aktivitására.

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

2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Drosophila* specifikus protein foszfatáz Y és N különlegessége, hogy a kifejtett hím egyedek tesztiszében fordul elő, funkciójukat azonban nem ismerjük. Felmerült bennünk a kérdés, milyen új regulációs lehetőségeket teremt az evolúciós szempontból fiatal PPY és PPN megjelenése a klasszikus protein foszfatázok mellett. Ennek megválaszolása érdekében fő célkitűzéseink a következők voltak:

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

3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Vektor konstrukciók összeállítása

A PPY és a PPN teljes kódoló szekvenciáját genomi DNS templárról amplifikáltuk, ugyanis ezen régiók egyik esetben sem tartalmaznak intront. A PPYR1 kódoló régiót az AT19571-pOTB7 jelű plazmidról szaporítottuk fel PCR módszerrel. A PPY és PPN cDNS-t az élesztő két-hibrid könyvtárszűrésnél alkalmazott pGBKT7 „csali”, az AT19571-pOTB7 plazmid által kódolt *Bgl*III - *Bcl*I cDNS szekvenciát pACT vektorba illesztettük. A PPY, PPN és PPYR1 fehérjék baktériumban történő termelése érdekében mindhárom PCR terméket a pET28a vektorba ligáltuk. Az emlős sejtekben történő expresszió megvalósításához a PPY és PPN kódoló régióját pcDEF3-HA, a PPYR1-et kódoló cDNS-t pedig módosított pcDEF3-Myc vektorba illesztettük.

Élesztő két-hibrid kísérletek

A két-hibrid kísérletben Y190 jelű élesztő törzset transzformáltuk a *Drosophila* 3. lárvális stádiumú cDNS könyvtárral és a PPY-, PPN-pGBKT7 vektorral. A sejteket 3-amido-1,2,4-triazol jelenlétében, szelektív táptalajon növesztettük fel. Ezt követően ellenőriztük a telepek hisztidin auxotrófiát komplementáló képességét, valamint a telepek β -D-galaktozidáz aktivitását. A telepekből izolált plazmid DNS-t *E. coli* XL-10 Gold törzsbe transzformálva szaporítottuk fel. A PPY esetében 21, a PPN esetében pedig 5 telepből származó plazmidot izoláltunk és szekvenálással azonosítottuk az inzertált cDNS-eket. A PPY-PPYR1 fehérje-fehérje kölcsönhatás specifikitásának igazolása érdekében a pACT-PPYR1 konstruktot együtt transzformáltuk a PPY-pGBKT7, majd a PPN-pGBKT7, valamint a *Drosophila* protein foszfatáz 1 négy különböző izoformáját kódoló pAS2 vektorral. Ezt követően ellenőriztük a transzformáns telepek szelektív táptalajon való növekedését és β -D-galaktozidáz aktivitását.

Rekombináns fehérjék előállítása

A rekombináns His-PPY, His-PPN és His-PPYR1 fúziós fehérjéket *E. coli* BLR (DE3) törzsben expresszáltuk a pET expressziós rendszer leírása szerint. A pcDEF3-HA-PPY, pcDEF3-HA-PPN valamint a pcDEF3-Myc-PPYR1 plazmidokat FuGENE 6 Transzfekciós Reagens segítségével juttattuk a COS-7 emlős sejtekbe. A COS-7 sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettük glutamin és hőinaktivált FBS, valamint gentamicin jelenlétében.

Nukleinsav vizsgáló módszerek

Az genom DNS-t a kifejtett *Drosophila*-ból, a teljes RNS-t a *Drosophila* tesztiszéből, ováriumból és embriókból tisztítottuk. A genom DNS *Hind* III, *Xho* I, *Eco* R I restrikciós endonukleáz enzimekkel kapott hasítási termékeit, illetve a *Drosophila* szervekből izolált teljes RNS-t Hybond-N⁺ nylon membránra vittük át, majd hibridzáltuk a radioaktívan jelölt teljes hosszúságú cDNS kódoló régiót tartalmazó próbával egy éjszakán keresztül Southern és Northern blot vizsgálatok céljából. Az RNS *in situ* hibridizációs kísérletekhez *Eco*RI restrikciós enzimmel linearizált AT19571-pOTB7 plazmidot használtunk ribonukleotid próbaként. Az RNS próbát T7 promóter alkalmazásával antiszensz digoxigenin-jelöléssel készítettük.

Fehérje vizsgáló módszerek

Az affinitáskromatográfiával tisztított és a dialízissel töményített fehérjék koncentrációját Bradford-módszerrel határoztuk meg. A fehérjék méretét és tisztaságát SDS-PAGE-en történő elválasztással végeztük standard fehérje elegy alkalmazásával. A rekombináns His-PPYR1 fehérje tömegspektrometriás

vizsgálatát MALDI-TOF módszerrel végeztük. A PPYR1 CD spektrumát teljes *Drosophila* RNS preparátum jelenlétében vagy anélkül vettük fel.

A PPY és PPYR1 fehérjék közötti kölcsönhatás kinetikáját felszíni plazmon rezonancián alapuló Biacore módszerrel végeztük. A PPY és PPYR1 fehérjék közötti kölcsönhatást megerősítettük „pull-down” módszerrel, oly módon, hogy a Myc-PPYR1-et tartalmazó COS-7 sejtek lizátumához His-PPY vagy His-PPN tisztított rekombináns fehérjét és Ni-NTA agarózt adtunk. A mintákat a Myc fehérjére specifikus antitesttel Western blot módszerrel vizsgáltuk. A His-PPYR1 fehérje proteáz érzékenységet tripszin, proteináz K enzimekkel és 20S proteasóma emésztéssel is megvizsgáltuk. A His-PPYR1 fehérje foszforilációját cAMP-függő protein kináz enzimmel végeztük [32 P]-ATP jelenlétében. A beépült radioaktivitást Cserenkov sugárzás alapján határoztuk meg. A reakciót követően a 32 P beépülését autoradiográfiával detektáltuk. A protein foszfatáz Y enzimaktivitását 32 P-vel jelölt mielin bázisos fehérje szubsztráttal mértük.

Immunológiai módszerek

A PPY-PPYR1 kölcsönhatás kimutatása érdekében a Myc-PPYR1-et és a HA-PPY-t kifejező COS-7 sejtek lizátumát immunprecipitáltuk hemagglutinin-specifikus antitesttel. Az immunkomplexben a Myc fehérjére specifikus antitesttel mutattuk ki a PPYR1 fehérjét Western blot módszerrel. A PPYR1-ellenes poliklonális antitestet nyulak immunizálásával állítottuk elő. A szérumból affinitáskromatográfiával tisztított PPYR1 specifikus immunglobulinokat Western blot és immunhisztokémiai kísérletekhez használtuk fel. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, a rekombináns fehérjék kimutatására Anti-Myc A14 nyúl poliklonális, anti-HA egér monoklonális és anti-penta-His monoklonális antitestet, a natív PPYR1 azonosításához anti-PPYR1 antitestet használtunk.

Az affinitástisztított anti-PPY és anti-PPYR1 antitesteket *Drosophila* embrió, testisz és ovárium preparátumok immunhisztokémiai vizsgálataihoz alkalmaztuk. A PPY és PPYR1 lokalizációjának azonosításához konfokális mikroszkópot használtunk.

4. EREDMÉNYEK

A PPY-nal kölcsönható fehérjék kimutatása

Élesztő két-hibrid módszerrel öt, a PPY-nal és egy, a PPN-nel kölcsönható fehérjét azonosítottunk. A protein foszfatáz Y-nal kölcsönhatott a CG15031 génről átiródó, *Vasa* intronikus génnel homológiát mutató, feltételezhetően RNS-kötő fehérje, a szignáloszóma CSN5 komponense (CG14884), a homospermidin szintetáz enzim (CG4362), egy aminosav transzporter (CG7255), valamint egy PP1-kötőként leírt fehérje (CG1553). A PPN esetében egyetlen fehérje kapcsolódását tudtuk kimutatni, ezt viszont 5 független klón is megerősítette. A CG6167 gén terméke közel 65 % homológiát mutat a humán PKC α kölcsönható (PICK1) fehérjével.

A PPY-CG15031 kölcsönhatás megerősítése és specifikitásának igazolása

A további vizsgálatok céljára a CG15031 Celera Genom azonosítóval jelölt gén termékét, a PPY-nal kölcsönható fehérjét választottuk. Southern blot kísérlettel megerősítettük a *Drosophila* Flybase adatbázisban található információt, mely szerint egyetlen CG15031 gén található az *ecetmuslica* genomban. A gén a *Drosophila* X kromoszómájának 13B3 régiójában lokalizálódik. A CG15031 cDNS-t korábban testisz könyvtárból izolálták. Mivel a PPY is testiszben található, a kölcsönhatásnak *in vivo* jelentősége lehet. Élesztő két-hibrid kísérlettel igazoltuk, hogy CG15031 géntermék kötődni képes a protein foszfatáz Y-hoz. A kölcsönhatás specifikitását mutatja, hogy a *Drosophila* protein foszfatáz 1 négy izoformája, és a testisz specifikus PPN sem lép kapcsolatba a CG15031 fehérjével. Ezen eredmények alapján a CG15031 génterméket elneveztük a PPY elsőnek azonosított regulátor alegységének (PPYR1).

A PPY-PPYR1 kölcsönhatás megerősítése érdekében COS-7 emlős sejtekben együtt fejeztük ki a PPY-hemagglutinin fúziós fehérjét (HA-PPY) és a PPYR1 myc epitóp szekvenciával fuzionált változatát (Myc-PPYR1). Ezt követően immunprecipitációt végeztünk anti-HA antitesttel, majd a precipitátumban a PPY és PPYR1 fehérjéket anti-HA és anti-Myc antitesttel detektáltuk. A HA-PPY mindkét esetben jelen volt a komplexben, a Myc epitópra specifikus antitest azonban csak a rekombináns PPYR1 jelenlétében adott jelet 47 kDa méretnél. Tehát a Myc-PPYR1 a HA-PPY fehérjén keresztül kapcsolódott az immunkomplexhez.

„Pull-down” kísérletben a baktériumban termeltetett és affinitáskromatográfiával tisztított PPY fehérjét (His-PPY) hozzáadtuk olyan COS-7 sejtek lizátumához, amelyek nagy mennyiségben termelték a Myc-PPYR1-et. A PPY N-terminális végén elhelyezkedő, hat hisztidinből álló fúziós peptid lehetővé tette a His-PPY Ni-agaróz gyantához való kötését. Azt, hogy a komplex megkötötte a PPYR1-et is,

anti-Myc antitesttel tudtuk kimutatni. A komplex kialakulásának specifikusát igazolja, hogy a His-PPN fehérje nem kötődött a PPYR1-hez. A PPY-PPYR1 kölcsönhatást tehát három független módszerrel is megerősítettük.

A His-PPY és His-PPYR1 között kialakuló fizikai kölcsönhatás kinetikáját felületi plazmon rezonancián alapuló módszerrel vizsgáltuk. A méréseket követően meghatároztuk a két fehérje közötti disszociációs állandót (K_d), amely $(6,2 \pm 1,6) \times 10^{-8}$ M ($n=3$) érték volt. Azonos körülmények között a His-PPN és a His-PPYR1 között a K_d érték sokkal magasabbnak bizonyult $(4,2 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ M ($n=3$). A mérések alapján számított disszociációs állandó négy nagyságrenddel volt magasabb a PPN felszínén átáramoltatott PPYR1 esetében a PPY felszínhez képest. Tehát a PPYR1 egy új specifikus PPY-kötő fehérje.

A rekombináns PPYR1 biokémiai jellemzése

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

A baktériumban kifejezett His-PPYR1 aminosav sorrendjét tömegspektrometriával ellenőriztük. A módszer segítségével 28 peptidet azonosítottunk, amely 77%-ban fedte le az általunk várt szekvenciát. A rekombináns PPYR1 elsődleges szerkezete tehát megegyezett a cDNS által kódolt fehérje aminosav sorrendjével, és alkalmas volt a fehérje *in vitro* biokémiai jellemzésére.

A PPYR1 SDS poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott molekulatömege az emlős sejtekben és a baktériumban termeltetett rekombináns fehérje esetében is nagyobbak adódtak (47 kDa), mint az aminosav szekvenciája alapján számított érték (33kDa). A látszólagosan nagyobb molekulatömeg a szerkezeti rendezettséget nem mutató fehérjék egyik jellemző tulajdonsága. A fehérje rendezetlenségét több független módszerrel is alátámasztottuk.

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

Ismeretes, hogy a rendezetlen fehérjék jó szubsztrátjai a proteázoknak, mert flexibilis szerkezetük bele tud illeszkedni az enzimek katalitikus zsebébe. Ezért összehasonlítottuk a His-PPYR1 és a BSA érzékenységet a proteináz K és a tripszin enzimekkel szemben. Azt tapasztaltuk, hogy a PPYR1 lebomlása mindkét esetben sokkal hatékonyabban ment végbe. Másik megfigyelésünk az volt, hogy a 20S proteaszóma ubiquitin módosítás nélkül is hatékonyan bontotta le a PPYR1-et,

hasonlóan az alfa-synuklein és p21^{Cip1} rendezetlen fehérjékhez. Ezt a folyamatot gátolni tudtuk a proteaszóma specifikus inhibitorával, az epoxomicinnel.

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

A PPYR1 RNS kötésének vizsgálata

A PPYR1 elsődleges fehérje szerkezetének összehasonlító vizsgálata egy hialuron/RNS-kötő domént azonosított. A domén szerkezet nagymértékű homológiája alapján feltételeztük, hogy a PPYR1 is képes RNS molekulákhoz kapcsolódni, ezért megvizsgáltuk a rekombináns His-PPYR1 RNS-kötő képességét CD-spektroszkópiás módszerrel. Felvettük külön-külön a His-PPYR1 és a *Drosophila* teljes fehérjementes RNS preparátum CD spektrumát, és ezen értékek összegzéséből számított adatokat összehasonlítottuk a fehérje-RNS elegy mért CD spektrumával. Azt tapasztaltuk, hogy a számított érték alacsonyabb, mint a kísérletesen meghatározott, tehát a rekombináns PPYR1 *in vitro* kötődni képes az RNS-hez. Azt feltételezzük, hogy egy időleges, gyenge kölcsönhatás alakul ki a fehérje és a ribonukleinsav között.

Megfigyeltük, hogy a PPYR1 specifikus poliklonális antitest pozitív immunreaktivitást mutat a *Drosophila*-ból izolált teljes RNS mintával szemben. A *Neurospora crassa* eukarióta fonalas gombából izolált teljes RNS preparátum viszont nem adott keresztreakciót a PPYR1 specifikus antitesttel. Ez az eredmény érthető, hiszen az *N. crassa* genomjában nem található a PPYR1-nek megfelelő gén. Azt feltételezzük, hogy a PPYR1 fehérje együtt marad az RNS molekulával a tisztítás során, és ezt a kapcsolatot csak az RNS lebomlása után lehet megszüntetni.

A PPYR1 foszforilációja

A számítógépes szerkezetvizsgálattal azonosítottunk egy feltételezhető cAMP-függő protein kináz (PKA) foszforilációs helyet a PPYR1 szekvenciában. Ennek igazolása érdekében a rekombináns His-PPYR1-et PKA enzimmal és [γ -³²P]ATP-vel inkubáltuk együtt és közel 1 mól foszfát beépülését tudtuk kimutatni His-PPYR1 fehérjében.

A foszforilálatlan PPYR1 gátolta a PPY aktivitását. A foszforilált forma hatékonyabb gátlószerek bizonyult. A foszforilált PPYR1 félmaximális gátló hatását a PPY aktivitására azonban egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban fejtette ki, mint azt a Biacore méréssel meghatározott PPY-PPYR1 K_d érték alapján számítottuk. A számítások és a mérések alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a PPYR1 enzimaktivitásra gyakorolt hatását a szubsztrát konformációjának

megváltoztatásán keresztül fejt ki. Kimutattuk továbbá, hogy a PPY képes defoszforilálni a PPYR1 fehérjét.

A PPYR1 génexpressziója

A PPYR1 mRNS kimutatására a teljes hosszúságú cDNS kódoló régióját használtuk próbaként Northern hibridizációban. A tesztiszben egy 1,7 kb, az ováriumban egy 1,4 kb méretű mRNS-t tudunk azonosítani. A korai embrióban nem volt kimutatható mennyiségben jelen a PPYR1 transzkript.

A PPYR1 mRNS szövetspecifikus kifejeződését a *Drosophila* ivarszervekben *in situ* hibridizációval követtük nyomon. A Northern blot eredményével összhangban a PPYR1 mRNS hiányzott a korai, 2. stádiumú embrióból és a későbbi 17. stádiumú embrióban sem tudtuk kimutatni. A transzkript jelen volt viszont a korai petekamra szomatikus- és ivarsejtjeiben is. A PPYR1 mRNS a petekamra follikuláris és dajkasejtjeiben halmozódott fel nagyobb mennyiségben. Az mRNS sejtplazma áramlással szállított a dajkasejtekből a 11. stádiumú petesejtbe. Valószínűleg a PPYR1 mRNS degradálódik a petesejt érése során, mert a korai embrióban már nem tudtuk kimutatni jelenlétét. Erős festődést figyelhettünk meg az elsődleges spermatociták sejtplazmájában, ami a PPYR1 mRNS jelenlétét jelzi a tesztisz ezen sejtjeiben.

A PPYR1 protein lokalizációja

A PPYR1 fehérje kifejeződését az *acetmuslica* egyedfejlődése során az általunk előállított poliklonális anti-PPYR1 antitesttel vizsgáltuk. Western blot kísérletben a korai, 2. stádiumú embrió esetében erős immunreakciót mutatott egy 47 kDa méretű fehérje, ennek mérete megegyezett a pozitív kontrollként alkalmazott rekombináns His-PPYR1 fehérjével. A jel erőssége csökkent a késői, 17. stádiumú embrió mintában, és az egyedfejlődés további lárva, báb, kifejlett imágó stádiumában nem volt kimutatható. A PPYR1 kifejeződését elsősorban a reproduktív szervekben vizsgáltuk Western blottal. Az ováriumból készült kivonatban egy 47 kDa méretű fehérjét mutattunk ki, amely méretét tekintve megegyezett az embrióban található fehérjével. A tesztiszből kimutatott fehérje mérete viszont 66 kDa volt, ez az eltérés összhangban van a Northern hibridizációval a tesztiszből kimutatott mRNS nagyobb méretével. Az ivarszervek eltávolítása után visszamaradt testből nem, vagy csak gyengén volt detektálható a fehérje.

Immunhisztokémiai módszerrel tanulmányoztuk a PPYR1 sejten belüli lokalizációját a *Drosophila* embrióban, az ováriumban és a tesztiszben. Elsőként az anyai eredetű gén termékét mutattuk ki az embrióban és az ováriumban. Az egyedfejlődési Western vizsgálattal összhangban erős jelölődést tapasztaltunk az

embrió korai, 2. stádiumában. A későbbi, 17. stádiumú embrióban a jel erőssége csökkent és elsősorban a kialakuló tápcsatorna területére koncentrált. A fehérje lokalizációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a PPYR1 a petekamra fejlődésének 7. állomásáig a follikuláris sejtekben és az ivarsejtben egyaránt jelen van. Magas szinten marad a follikuláris és dajkasejtben a 9. stádiumú petekamrában, míg a petesejtben lecsökken mennyisége. A 11. stádiumban teljesen hiányzik a petesejtből a fehérje, és a magasabb felbontás ellenére sem mutatható ki. A felbontást tovább növelve gyenge festődést láthatunk a dajkasejtekből kiinduló sejtplazma beáramlásának területén. A PPYR1 tehát a dajkasejtekből fehérje formában szállítódik a petesejtbe, viszont nehezen kimutatható ebben a környezetben. Ezt az ellentmondást a PPYR1 RNS-kötő képessége alapján tudtuk feloldani. Amennyiben előkezeltük a fixált petekamra preparátumot RNáz enzimmel az immunfestés előtt, a PPYR1 jól festődött kis és nagy felbontás mellett is a 11. stádiumban. A Western blot kísérletben azt tapasztaltuk, hogy a PPYR1 zigótikus formában termelődik a tesztiszben, ahol a PPY is jelen van. A két fehérje közötti kölcsönhatás kialakulásának ebben a szervben van fiziológiás jelentősége. Immunfestéssel kimutattuk, hogy mindkét fehérje jelen van a tesztisz apikális részén elhelyezkedő csírarsejtben és az elsődleges spermatocitákban is. A PPYR1 elsősorban a sejt citoplazmájában, a PPY pedig a sejtmagban volt kimutatható.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

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

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

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dr. Dombrádi Viktor témavezetőm, Dr. Gergely Pál intézetvezető és az Orvosi Vegytani Intézet munkatársai mellett köszönetet szeretnék mondani az Oxfordi Egyetem Zoológia tanszékén dolgozó Dr. Luke Alphey-nak, Dr. Vissi Emesének és Dr. Szöör Baláznak; az MTA Enzimológiai Intézetben dolgozó: Dr. Friedrich Péternek, Dr. Tompa Péternek és Dr. Tantos Ágnesnek; illetve az MTA SzBK, Genetikai Intézetében dolgozó Dr. Gausz Jánosnak, Dr. Ádám Gézának, Dr. Erdélyi Miklósnak és Szuperák Milánnak, akik segítségükkel hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

7. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

E. Kókai, Á. Tantos, E. Vissi, B. Szöör, P Tompa, J. Gausz, L. Alphey, P. Friedrich, V. Dombrádi: CG15031/PPYR1 is a gonad specific intrinsically unstructured protein that interacts with protein phosphatase Y. *Arch Biochem Biophys.*; 1;451(1):59-67 (2006) IF: 3,152

E. Kókai, M. Szuperák, L. Alphey, J. Gausz, G. Ádám, V. Dombrádi: Germ line specific expression of a protein phosphatase Y interacting protein (PPYR1) in *Drosophila*. *Gene Expr Patterns*; (7):724-9. (2006) IF: 1,794

Egyéb közlemények

T. Zeke, B. Szöör, E. Kókai, E. Yatzkan, O. Yarden, K. Szirácz, Z. Fehér, P. Gergely and V. Dombrádi: Analysis of protein phosphatase 1 gene expression in *Neurospora crassa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 134, 161-170. (2003) IF: 1,404

B. Csóka, T. Zeke, E. Kókai, J. Doonan, H. Fox, Z. Fehér and V. Dombrádi: Expression of the *bimG* gene from *Aspergillus nidulans* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetic Newsletters*, No. 49 (2002)

Könyv fejezetek

V. Dombrádi, E. Kókai and I. Farkas: Protein phosphatase 1. *Topics in Current Genetics* Vol. 5, 21-44. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2004)

E. Kókai, J. Gausz and V. Dombrádi: Biochemical and genetic analysis of the PPP family of protein phosphatases in *Drosophila melanogaster*. *Protein modules in Cellular Signalling*, Series A: Life Sciences-Vol. 318, pp.222-231. (2001)

E. Vissi, E. Csordás Tóth, F. Ayaydin, E. Kókai, P. Gergely, D. Dudits, V. Dombrádi: The Protein Phosphatases and Their Functions in Plants. *Protein modules in Cellular Signalling*, Series A: Life Sciences-Vol. 318, pp.195-201. (2001)

Előadások és poszterek az értekezés témájában:

E. Kókai, L. Mikló, G. Jenei, J. Szabad, V. Dombrádi: Functional Analysis of *Drosophila melanogaster* Protein phosphatases. NATO/FEBS Advanced Study Institute, Protein Modules in Cellular Signalling, St. Martin de Londres, France, 2000

Kókai E., Zeke T., Csóka B., Dombrádi V: A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok összehasonlító analízise. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya VI. Munkaértekezlete, Sárospatak, 2001

Kókai E., L. Alphey, Dombrádi V: *Drosophila* új típusú protein foszfatázok katalitikus alegységével kölcsönható fehérjék azonosítása. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya VII. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002

E. Kókai, L. Alphey, V. Dombrádi: Functional analysis of PPY and PPN testis specific protein phosphatases of *Drosophila melanogaster*. EMBO Conference/FEBS Advanced Course EuroPhosphatases, Barcelona, Spain, 2003

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

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

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

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

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