

Vizsgálataink eredeti célja az volt, hogy a genom adatbázisok alapján kiszemelt *Drosophila* protein foszfatáz gének funkciójának megismeréséhez közelebb jussunk. Adatbázis kutatásunk során a genomikus adatbankokban 16 eddig még nem vizsgált foszfatáz gént találtunk, amelyek közül a kutatások első szakaszában hetet választottunk ki a vizsgálatok tárgyaként. 1 katalitikus és 6 regulátor alegységre próbáltunk mutánsokat előállítani. Minden esetben a mutánsok készítését arra alapoztuk, hogy a gén közvetlen közelében elhelyezkedő P-elem inszerciót transzpozáz forrás segítségével mobilizáltuk. Minden egyes kísérletben 250-300 egyedi jump-starter hímet választottunk ki amelyek mindegyike hordozta a megfelelően markerelt (sárga szemszín) transzpozont és egy másik autoszómán pedig a transzpozáz forrást. A hímeket ezután white háttérű (fehér szemszínű) kettős balanszer kromoszómát hordozó szűz nőstényekkel kereszteztük. A következő nemzedékben pedig néztük, hogy a hímelekben elveszett-e a sárga szemszínt adó white + markergén. Ha ilyen állatokat találtunk egy fiolában, akkor ezeket olyan deléciós kromoszómát hordozó törzssel kereszteztük, amely a számunkra fontos protein foszfatáz gént biztosan eltávolítja. Amennyiben az ilyen állatok valamilyen fenotípust (pl. letalitás) mutattak, akkor ezekből törzset hoztunk létre. A 7 kiinduló törzs közül 6 esetben kaptunk olyan törzset, amely a gént eltávolító delécióval szemben letálisnak bizonyult. Az első mutagenézis eredményeit az alábbi táblázat összegzi.

A gén neve	jump-starter hímek száma	deléciós kromoszóma	letális allélek száma
CG3245	345	Df(2R)Egfr	22
CG8980	285	Df(2R)P803	1
CG5891	312	Df(3L)st-g24	26
CG9238	489	Df(3L)fzGS1a	3
CG6268	308	Df(3R)crb-F89-4	5
CG17291	297	Df(2L)TE29Aa5	0
CG11217	325	Df(2R)cn-Sb	7

Az első fázisban tehát sikerült olyan mutánsokat előállítani, amelyek a foszfatáz gének közelébe térképeződtek. A továbbiakban meghatároztuk az egyes mutánsok letális fázisát és az estek mindegyikében pete- vagy lárva letalitást kaptunk. Ezen az alapon megkezdtük az izolált allélek molekuláris töréspontjainak azonosítását polimeráz láncrekciók segítségével. A kiválasztott gének közül 3 esetben (CG5891, CG6238 és CG 11217) találtunk olyan alléleket, amelyek molekuláris töréspontot hordoztak a protein foszfatáz génekben. A genomikus adatbázisok általános hozzáférhetősége miatt azonban időközben kiderült, hogy a fent említett három gént más kutatócsoportok is megvizsgálták. A CG5891 gén egy olyan miozin foszfatáz gént kódol, amelyet egy japán kutatócsoport más módon azonosított és megállapította, hogy a gén terméke az embrionális korban a dorzális hasadék záródásához szükséges. Ezzel párhuzamosan egy amerikai laboratórium megállapította, hogy a CG11217 gén a kalcineurin foszfatáz egy regulátor alegységét kódolja. A CG6238 génről pedig egy másik amerikai csoport közölte, hogy a jak/stat jelátviteli útban van funkciója.

Mindezek az új eredmények arra készítettek bennünket, hogy az eredeti tervet némileg módosítva a továbbiakban lehetőleg olyan speciális génekre koncentráljunk, amelyek estleges szerepét más csoportok nem vizsgálták. Így került sor a PP1 két kevésbé ismert glikogénkötő alegységével homológ CG9238 és CG9619 és regulátor alegységek részletes vizsgálatára, illetve a PPY és PPN új típusú foszfatázok, valamint a PPY-nal kölcsönható fehérjét kódoló CG15031 gén tanulmányozására. Az alábbiakban az egyes génekkel kapcsolatos kutatások eredményeit ill. ismereteink jelenlegi állását ismertetjük.

A CG9238 gén vizsgálata

Megállapítottuk, hogy a CG9238 gén terméke (PPP1R3C homológ) az emberi protein foszfatáz 1 (PP1) R5 glikogénkötő alegységgel 42% szekvencia azonosságot mutat és tartalmazza a katalitikus alegységhez való kötődésért felelős szekvenciát is, ami azt jelzi, hogy esetleg a PP1 katalitikus alegységgel lép kapcsolatba. A feltételezett kapcsolat bizonyítására élesztő kettős-hibrid rendszerrel végeztünk kísérletet. A CG9238 gént és a *Drosophila* PP1 mind a négy ismert izoformáját megfelelő kombinációban PJ-6 vektorba vittük és vizsgáltuk a fehérje-fehérje kölcsönhatást jelző béta-galaktozidáz enzim aktivitását. A kísérletek azt mutatták, hogy a CG9238 képes mind a négy *Drosophila* PP1 alegységhez kötődni. Az egyes izoformák kölcsönhatásának mértéke hasonlóknak bizonyult.

A CG9238 protein foszfatáz regulátor fehérjét kódoló génre általunk izolált mindhárom lehetséges allél a 2. lárvastádium korai szakaszában okoz letalitást. Az allélek molekuláris töréspontjait PCR segítségével próbáltuk térképezni. Mindhárom allél esetében igazoltuk, hogy ezek valószínűleg nagyméretű deléciók, a gén teljes egészében hiányzik. A letális fenotípus így a mutációk következménye lehet, mivel nincs a közelben más ismer funkció kódoló gén. A letális fenotípus semmilyen egyedi jellegzetességet nem mutatott, ezért a FLP-FRT rendszer használatával homozigóta mutáns klónokat állítottunk elő a szemben és a toron felnőtt legyekben. Mindkét esetben a homozigóta mutáns klónok nagymértékű sejtpusztulást eredményeztek és így feltételezhető, hogy a gén hiánya sejtletalitást okoz. Ezután az ovoD-FRT rendszer alkalmazásával vizsgáltuk, hogy a géntermékre szükség van-e a csírvonalban. Ilyen körülmények esetén hő-sokk alkalmazásával lehet nőstény állatokban mutáns klónokat indukálni. A hő-sokkolt állatok petefészkeiben indukált mutáció hatására a nőstények nem raktak petéket és a felboncolt állatokban a petekamrák hiányát tapasztaltuk. Ez viszont arra utalt, hogy a mutáns fenotípus nem a csírvonal klónok miatt jön létre, hanem a CG9238 gén az ovoD génnel léphetnek kölcsönhatásba.

Homozigóta és heterozigóta lárvákban vizsgáltuk a glikogén szintézis mértékét, mivel az emlős homológban ez a funkció hibás. Az eredmények azt mutatták, hogy a mutánsokban a glikogén mennyiség a vad típushoz képest jelentősen kevesebb és fordított arányban van a CG9238 gén dóziséval.

A mutáns allélek és a CG9238 cDNS felhasználásával megkíséreltük a letális fenotípus menekítését. Először a cDNS-t pUAST vektorba építettük, majd a transzgént P-elem transzformációval legyekbe vittük és szemszín alapján azonosítottuk a CG9238 transzgént hordozó transzformáns vonalakat. A három független vonal segítségével olyan kombinációkat állítottunk elő, amelyek homozigóta mutáns háttéren hordozták az UAS szekvenciával ellátott transzgént és egyúttal olyan Gal4 meghajtóval voltak ellátva, amelyek a transzgén általános vagy szövetspecifikus kifejeződését biztosították. Mivel a cDNS alapú menekítés nem minden esetben sikeres ezért keresztezésekkel olyan kombinációkat hoztunk létre, amelyek lehetővé tették a homozigóta mutánsok szelekcióját. Ezek a kísérletek azonban azt igazolták, hogy a transzgénnek ill. azok emelt dózisa sem biztosította a letális fenotípus javítását. Ezért a CG9238 gén genomikus szekvenciáját hordozó Bac klónokat szereztünk be a menekítéshez. Ezek szubklonozása jelenleg is folyamatban van. A meglévő eredmények további kísérletekkel történő kiegészítése után tervezzük azok publikálását .

A CG9619 gén vizsgálata

A CG9619 jelű PP1 glikogén kötő regulátor alegység (PPP1R3D) génre is megpróbáltunk új mutáns alléleket előállítani. A BG 02805 nevű P-elem mobilizálásával. A gén közvetlen közelében ezidáig 18 lehetséges lárva letális mutáns allélt azonosítottunk.

Komplementációs tesztben ezek közül viszont csak 4 bizonyult egymással allélikusnak. Az ezidáig használt PCR primerekkel azonban a génben molekuláris töréspontot nem tudtunk kimutatni. A fehérjével szemben sincs ellenanyagunk ezért ezekkel a mutánsokkal további vizsgálatokat nem végeztünk.

A CG15031 gén vizsgálata

Munkánk egy másik részében az általunk felismert PPY protein foszfatázzal kölcsönható CG15031 (PPYR1) gén által kódolt fehérjét tanulmányoztuk. Először Southern hibridizációval megerősítettük, hogy a *Drosophila* genomban csak egyetlen ilyen gén található. Ezután a gén termékét *E. coli*-ban termeltettük, majd nyúlban poliklonális antitestet állítottunk elő a rekombináns fehérjével szemben. A kapott antitest nagy hígításban is specifikusan ismerte fel a PPYR1fehérjét és így jól használhatónak bizonyult a Western blot ill. immunolokalizációs kísérletekben. Western blot kísérletben kimutattuk, hogy a fehérje az embrionális korban fordul elő a legnagyobb mennyiségben. A fehérjének van egy maternális 47 kDa molekulatömegű formája, míg a herében egy 64 kDa tömegű izoforma található. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a kétféle szövetben eltérő promoter használat fordul elő.

Immuncitokémiai módszerrel megvizsgáltuk a maternális és zigótikus formák szöveti eloszlását és azt találtuk, hogy a gén már a petefejlődés legkorábbi szakaszában is kifejeződik és eleinte inkább citoplazmatikus eloszlást mutat. Úgy tűnik, hogy a dajkasejtekben képződik, majd citoplazmatikus transzporttal jut el a petesejtbe és a kései petesejtben RNS molekulákkal képez komplexet. Korai embriókban a maternális fehérje koncentrációja igen magas és később fokozatosan csökken. A zigótikus fehérje ezzel szemben herespecifikus és az elsődleges spermaticiták citoplazmájában található. Ezzel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy a PPY fehérje is a spermaticitákban fordul elő, ahol inkább sejtmagi megoszlást mutat. Eredményeink alapján az is valószínűnek látszik, hogy a PPY és a CG15031 fehérjék in vivo körülmények mellett is kölcsönhatásba léphet egymással. In situ hibridizációval kimutattuk, hogy a CG15031 mRNS előfordul a fejlődő sperma sejtekben ill. a petefészkekben. Mivel a PPY csak a herében található, ezért feltételezhető, hogy a maternális izoforma a foszfatáz regulációtól függetlenül, valószínűleg az RNS-hez kötött formában fejti ki a hatását az ováriumban. A génextpressziós mintázatról szóló MOD GEP közleményünk nyomdában van.

Elvégeztük a CG15031 géntermék biokémiai és biofizikai jellemzését. Célzott élesztő két-hibrid kísérletekkel bebizonyítottuk, hogy a CG15031 gén terméke nem lép kölcsönhatásba egyik PP1 katalitikus alegység izoformával sem, és nem alkot komplexet a *Drosophila* herében specifikusan expresszáldó PPN új típusú protein foszfatázzal sem. Megállapítottuk, hogy a fehérje csak a PPY protein foszfatázzal képes kölcsönhatásba lépni. Ezek alapján a gén termékét PPYR1-nek neveztük el. A PPYR1 és PPY közötti kölcsönhatást megerősítettük együttes immun-precipitáció és „pull down” kísérletekkel is. Plazmon rezonancia spektroszkópiával meghatároztuk a bakteriálisan expresszált PPYR1 és PPY közötti disszociációs állandót. A rekombináns PPYR1 abnormális SDS poliakrilamid gélelektroforetikus mobilitása, CD spektruma, proteáz érzékenysége és hőstabilitása alapján bebizonyítottuk, hogy a szerkezeti jóslattal összhangban a fehérje rendezetlen struktúrát vesz fel. In vitro kísérletekben megerősítettük a PPYR1 RNS kötő képességét és kimutattuk, hogy a fehérje foszforilálható a cAMP függő protein kinázzal. A PPYR1 csak kis mértékben gátolja a PPY enzimaktivitását és a fehérje foszforilációja a gátló képességet nem módosítja jelentős mértékben. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a PPYR1 egy eredendően

rendezetlen felépítésű RNS kötő fehérje, amely fehérje-fehérje kölcsönhatás révén a spermaticitákban a PPY-t más fehérjével együtt az RNS pool közelében lokalizálhatja. Az erre vonatkozó adatokat tartalmazó kéziratunk elbírálása az ABB-nél még folyamatban van.

A CG3245 gén vizsgálata

Mivel a here specifikus protein foszfatáz gének számunkra fontosnak bizonyultak ezért a PPN-58A (CG3245) foszfatáz katalitikus alegység génnel szemben is megpróbáltunk új mutáns alléleket izolálni. Erre a célra az l(2)07837 white+ marker mutációt hordozó P-elem inszerciót használtuk fel. Ebben az esetben azonban a P-elem a génhez képest több mint 5,5 kilóbázis távolságban helyezkedik el így kevés annak a valószínűsége, hogy a remobilizáció következtében létrejövő pontatlan kivágódások a gént érintik. Sajnos erre a génre még deléciós törzs sem áll a rendelkezésünkre. A kísérletet elvégezve 22 homozigóta letális vonalat hoztunk létre. Az eddig alkalmazott PCR primerek segítségével nem találtunk olyan mutációt, amely a gént érintené. A mutációk mindegyike pete vagy lárva letális. Jelenleg a PPN-58A fehérjével szemben általunk készített ellenanyag tisztítása folyik. Ennek előállítása a mutánsok azonosításához szükséges. Ezzel párhuzamosan RNS interferencia segítségével is megkíséreljük a gén kiiktatását. A PPN funkciójának megállapítása még további kutatómunkát igényel.

Az eredeti projekt terv a kísérletek eredményei alapján módosult. A pályázati periódus letelte után még további vizsgálatokat tervezünk, hogy az eddigi eredményeink további részleteit is közölni tudjuk. Ebben a tekintetben különösen ígéretesek a CG9238, és CG3245 génekkel folytatott vizsgálataink.

A pályázati időszak alatt a vizsgálatban résztvevő kutatók személyi összetételében is történetek változások. A szegedi csoporthoz 2003 januárjában csatlakozott Ádám Géza és 2004 szeptemberében Pop Ferenc ITC hallgató, aki később, mint PhD hallgató vett részt a kutatásokban. A debreceni csoporthoz 2004 szeptemberében csatlakozott Papné Sinka Rozália. Ádám Géza részvételével lehetőség nyílt a protein foszfatázokhoz hasonlóan fontos egyéb jelátviteli utakban szerepet játszó *Drosophila* szabályozó gének funkciójának vizsgálatára is. Ezek közül szeretnénk kiemelni a bal-jobb asszimmetria kialakításához fontos gének, a 26S proteaszóma és a filamin-240 gén vizsgálatát.

A bal-jobb asszimmetria kialakulása *Drosophilában*

Drosophila herecsatorna modell felhasználásával azonosítottuk a *Myo31DF* gént, amelynek funkcióvesztéses mutációi a bal-jobb testtengely teljes megfordulását okozzák. A *Myo31DF* egy nem konvencionális miozin fehérjét kódol, amely az aktin vázon keresztül szabályozza a bal-jobb testtengely polaritását. Kimutattuk, hogy a *Myo31DF* fehérje a genitális imágókorongok 8-as abdominális szegmentjében a β -catenin-nel kölcsönhatva fejt ki funkcióját. Igazoltuk, hogy a *Myo31DF* részt vesz a sejten belüli vezikuláris transzportban. Eredményeinkről szóló Nature közleményünk nyomdában van.

A 26S proteaszóma vizsgálata

A proteaszóma alegységek eloszlását *Drosophila* fejlődő petekamrákban tanulmányoztuk. Azt találtuk, hogy mind a katalitikus, mind a regulátor alegység dinamikus, szövet és fejlődés specifikus eloszlást mutat. Csírasejtek közül a korai petesejtek magjaiban mind a két alegység szelektív felhalmozódása figyelhető meg, míg a petesejtekkel azonos eredetű dajkasejtek sejtmagjai proteaszóma mentesek. A csírasejteket határoló folliculáris sejtekben a korai fejlődési stádiumokban csak citoplazmatikusan lokalizálódnak a proteaszóma alegységek, később viszont a sejtmagba vándorolnak. A témával kapcsolatos közleményünk megjelent a MOD GEP hasábjain.

A filamin-240 gén kifejeződése *Drosophila* vérsejtekben

A gén kifejeződését immunfluoreszcenciával és Western blot analízissel vizsgáltuk. Sikerült megállapítani, hogy a gén kizárólag a lamellocitákban fejeződik ki. A *cher1* homozigóta lárvákban nem képződik filamin fehérje, de ha ezekben az állatokba bevisszük a teljes hosszúságú filamint kódoló transzgént akkor a fokozott mértékű lamellocita differenciáció nem jön létre. Mindez azt mutatja, hogy a filamin-240 fehérje a lamellocitákban valószínűleg gátolja a differenciációt. Ezekből a megfigyeléseinkből egy kéziratot készítettünk és közlésre beküldtük a Mechanism of Development című lapba. A kézirat elbírálása folyamatban van.