

A PP4 foszfatáz és a Centrobín kapcsolata a DNS hibajavítás késői szakaszaiban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Réthy-Nagy Zsuzsánna

Témavezető: Dr. Lipinszki Zoltán

tudományos főmunkatárs

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Tudományegyetem



2023

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
1.1. A fehérje foszforiláció szerepe a sejtben	5
1.2. A foszfatázok csoportosítása	6
1.3. A foszfofehérje foszfatázok (PPP) felépítése és célfehérje-kötő mechanizmusuk	11
1.4. A PP4 foszfatáz felépítése	12
1.4.1. Az R3 alegység felépítése	13
1.4.2. Az EVH1 domének jelentősége	14
1.5. A DNS hibajavító mechanizmusok	15
1.6. A foszfatázok szerepe a DNS hibajavításban	19
1.7. A PP4 foszfatáz szerepe a DNS hibajavításban	19
1.8. A centroszóma és a DNS hibajavító fehérjék kapcsolata	22
1.9. A PP4 megjelenése a centroszómán	23
1.10. A Centrobin fehérje centroszómális funkciója	24
1.11. A Ctb szerepe a DNS hibajavításban	24
2. Célkitűzés	26
3. Anyagok és módszerek	27
3.1. DNS konstrukciók	27
3.1.1. Klasszikus klónozás	27
3.1.2. Gateway klónozás	27
3.2. Helyspecifikus mutagenézis	28
3.3. Rekombináns fehérjetermelés és affinitás-tisztítás	29
3.4. <i>In vitro</i> kötési kísérletek	29
3.5. Sejtkultúrák fenntartása	30
3.6. Ko-immunoprecipitáció	31
3.7. Géncsendesítés siRNS-ek felhasználásával	32
3.8. γ H2AX sejtmagi fókuszok számolása	32
3.9. A homológ rekombináció sikerességének mérése humán sejtekben	33
3.10. Mitótikus kromoszóma preparálás és jellemzés humán sejtekből	33
3.11. Ctb csendesítés és menekítés Flag-Ctb variánsokkal	34
3.12. Western blot kísérletek	34
3.13. Géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése qPCR segítségével	35
3.14. Immunfluoreszcencia	36

3.15.	Felhasznált ellenanyagok	36
3.16.	Statisztikai elemzés	37
4.	Eredmények	38
4.1.	A PP4 foszfatáz R3 alegységének konzervált szubsztrátum-felismerő mechanizmusának vizsgálata	38
4.2.	A teljes hosszúságú Flag-Ctb és a Flag-Ctb fragment fehérjék sejtben való lokalizációjának vizsgálata.....	41
4.3.	A humán PP4 R3 és Ctb kölcsönhatásának vizsgálata <i>in vivo</i> módszerrel	43
4.4.	A PP4R3 és Ctb együttműködése a DNS hibajavításban.....	44
4.4.1.	A PP4 alegységek és Ctb hiánya késést okoz a DNS hibajavításban	44
4.4.2.	A PP4 és Ctb csendesítés hatására jelentősen lecsökken a homológ rekombináció hatékonysága	49
4.4.3.	A PP4 alegységek és Ctb hiányában kromoszóma hibák jelentkeznek a mitózisban.....	50
4.5.	A Ctb ATR kináz általi foszforilációs helyének vizsgálata	52
4.5.1.	<i>In vitro</i> kötési kísérlet a Ctb ATR foszforilációs helyének mutáns változatai és a PP4 R3A és R3B alegységek közt	52
4.5.2.	<i>In vivo</i> kötési kísérlet a Ctb Ser781 pontmutánsai és a PP4R3A/B alegységek között	54
4.5.3.	A Ctb csendesítés és röntgenkezelés hatására kialakuló hibás kromoszóma morfológia menekítése.....	55
5.	Megbeszélés	58
6.	Köszönetnyilvánítás	62
7.	Irodalomjegyzék	63
8.	Magyar nyelvű összefoglaló	74
9.	Angol nyelvű összefoglaló	78
10.	Függelék	82

Rövidítések jegyzéke

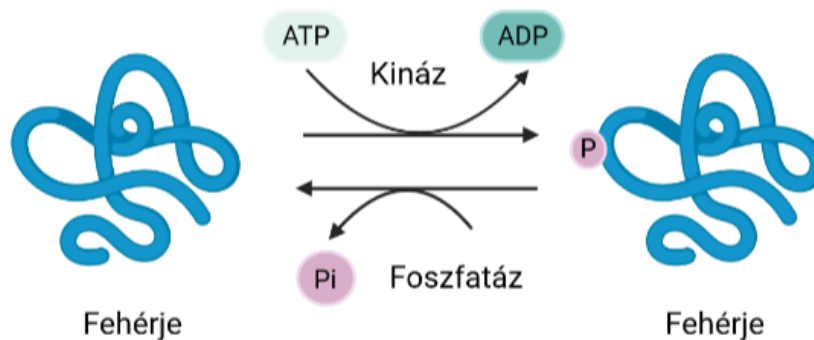
53BP1	P53-binding protein 1
ABA	Abszcizinsav
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ala/A	Alanin
APC	Anaphase-promoting complex
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated kinase
ATP	Adenozin tri-foszfát
ATR	Ataxia Telangiectasia and RAD3-related kinase
BAF	Barrier to Autointegration Factor
BSA	Szarvasmarha szérum albumin
Chk1	Ellenőrzési pont kináz 1
Chk2	Ellenőrzési pont kináz 2
CK2	Casein kináz-2
Cmm	Centroszóma mínusz mikrotubulus
Co-IP	Ko-immunoprecipitáció
CPT	Kamptotecin
Ctb	Centrobin
DR4	Death receptor 4
DBC1	Deleted in Breast Cancer-1
DDR	DNS-károsodási válasz
DNA-PK	DNS-függő fehérje kináz
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DSP	Kettős specificitású foszfatázok
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGTA	Etilén-glikol-tetraecetsav
EVH1	Enabled (Ena)/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) homológ 1 domén
FBS	Magzati borjú szérum
FCP/SCP	Formin sapkás fehérje/ Kromoszóma kondenzációt felügyelő foszfatázok
Fifl	Falafel, <i>Drosophila melanogaster</i> R3 alegység
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje
GST	Glutation S-Transzferáz
Gy	Gray
HAD	Halosav dehidrogenáz
HSF1	Heat shock factor 1
HR	Homológ rekombinációs hibajavító mechanizmus
HRP	Torma peroxidáz
Ile/I	Izoleucin
IR	Ionizáló sugárzás
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
IVTT	Kapcsolt <i>in vitro</i> transzkripció/transzláció
KAP1	KRAB-associated protein 1
LMW-PTM	Kis molekulású fehérje Tyr foszfatázok

MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MEI-1	Meiotic spindle formation protein 1
Met/M	Metionin
MKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MTOC	Mikrotubulus szervező központ
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NHEJ	Nem homológ vég illesztési hibajavító mechanizmus
NMDA	N-methyl-D-aspartate
ORF	Nyitott leolvasási keret
PAGE	Poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	Foszfát puffer
PCM	Centroszómális anyag
PCR	Polimeráz láncreakció
PFA	Para-formaldehid
Phe/F	Fenilalanin
PIC	Proteáz inhibitor koktél
Plk1	Polo-like kinase 1
Plk4	Polo-like kinase 4
PMSF	Fenil-metil-szulfonil fluorid
PP4	Fehérje foszfatáz 4
PPP	Foszfofehérje foszfatáz
PPM	Fém-függő fehérje foszfatázok
Pro/P	Prolin
PTM	Poszttranszlációs módosítás
PTP	Fehérje tirozin foszfatázok
PVDF	Polivinilidén-fluorid
RAD53	Sugárzásra érzékeny 53 kináz
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reaktív oxigén gyök
SDS	Nátrium dodecil szulfát
Ser/S	Szerin
siRNA	Kis interferáló RNS
SLiM	Short linear motifs
TBS	Tris-sel pufferezt sóoldat
Trp/W	Triptofán
Tyr/Y	Tirozin
Thr/T	Treonin
UV	Ultraibolya sugárzás

1. Bevezetés

1.1. A fehérje foszforiláció szerepe a sejtben

A fehérjék poszttranszlációs módosításai (PTM) kulcsfontosságú szerepet játszanak a polipeptidek, és ezáltal a sejt életében. A leggyakoribb PTM-ek egyike a reverzibilis fehérje foszforiláció: a sejtekben található fehérjék harmada legalább egyszer foszforilálódik a sejtciklus során (1). A módosításnak szerepe van többek között a metabolizmus, az ozmotikus stresszre adott válasz, a növekedés, a DNS hibajavítás, valamint a sejtosztódás szabályozásában (2–6). A foszforiláció következtében egy kináz enzim, az ATP γ -foszforil csoportját egy észter reakcióban az akceptor fehérje egyik aminosavának oldalláncára rakja (1. ábra). A foszfát csoportot képesek eltávolítani a fehérje foszfatázok. Állatokban és növényekben leggyakrabban a szerin (Ser, S), a tirozin (Tyr, Y), és a treonin (Thr, T) aminosavak foszforilálódnak, amelyeknek aránya a gerincesek sejtjeiben a következőképpen alakul: 1800:200:1 (pSer: pThr: pTyr) (1,7). A baktériumok és gombák szignáltranszdukciós folyamatai során előfordul még a hisztidin és az aszparaginsav aminosavak foszforilációja is (8,9).

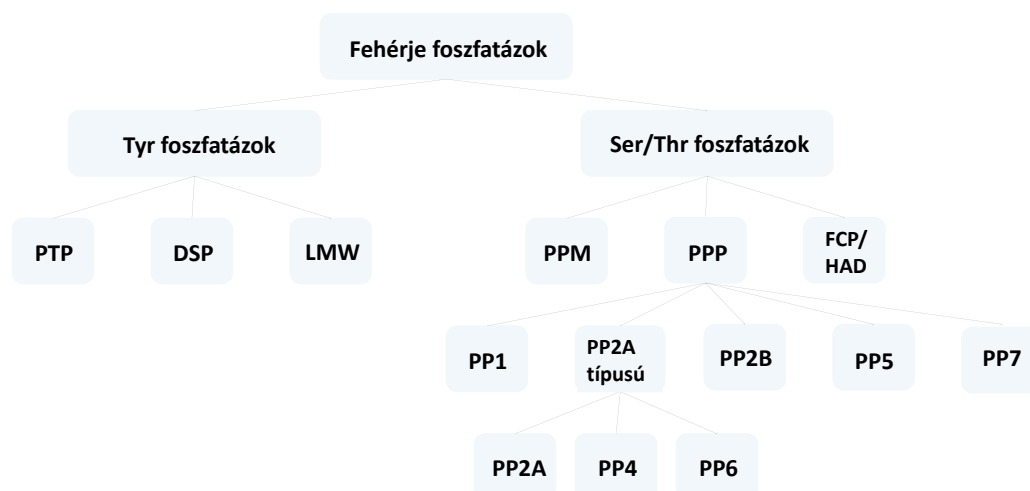


1. **ábra. A reverzibilis fehérje foszforiláció.** A foszforiláció és a defoszforiláció két ellentétes hatású reakció. Előbbit a fehérje kinázok katalizálják energia felhasználásával, míg utóbbit a fehérje foszfatázok. Foszforilációkor az ATP-ről a foszforil csoport a fehérjére egyik aminosavának oldalláncába épül be, míg defoszforilációkor a fehérje mellett egy szervetlen foszfát (Pi) keletkezik.

A kinázok egyszerűbb szerkezetű, többnyire monomert vagy egy szabályozó alegységgel dimert (például a ciklin függő kinázok) alkotó fehérjék, amelyek hasonló biokémiai mechanizmus alapján működnek (10). A foszforiláció következtében gyors konformáció változás által közel kerül egymáshoz az ATP-t kötő N-terminálison helyezkedő β -redő és a C-terminális α -hélice, amely a szubsztrátumot köti (11). A foszforiláció ellentétes reakciója a defoszforiláció, amit a háztartási gének egy jelentős csoportja, a foszfátázok katalizálnak. Szerkezetüket tekintve a foszfátázok jóval bonyolultabb enzimek, hiszen különböző foszfátázok eltérő aktív centrummal rendelkeznek, valamint gyakran különböző mechanizmusokat használnak a hidrolízishez (12). Míg a humán genomban több mint 500 fehérje kináz ismert, ezek közül 90 Tyr kináz, és közel 400 Ser/Thr kináz, addig megközelítőleg csak 150 fehérje foszfátáz, 107 Tyr foszfátáz és 30 Ser/Thr foszfátáz ismerünk (7,13). A nagy számbeli különbséget úgy ellensúlyozza a sejt, hogy a például a foszfofehérje foszfátázok (angolul: phosphoprotein phosphatase, PPP) esetében a katalitikus alegységek különböző regulátor alegységgel, eltérő komplexeket, úgynevezett holoenzimeket alkotnak. A regulátor alegységek meghatározzák a komplex szubsztrátum garnitúráját, a holoenzim helyét a sejtben és gyakran befolyásolják azt, hogy a komplex mely inhibitorokkal gátolható (7,14).

1.2. A foszfátázok csoportosítása

A foszfátázokat többnyire az alapján csoportosítjuk, hogy a fehérje mely aminosaváról távolítják el a foszfát csoportot. Két nagy csoportot különítünk el a Tyr foszfátázokat és a Ser/Thr foszfátázokat (2. ábra).



- 2. ábra. A fehérje foszfatázok csoportosítása.** Az alapján, hogy a szubsztrátum mely aminosaváról távolítják el a foszfát csoportot, két nagy családot különítünk el: Tyr foszfatázok és a Ser/Thr foszfatázok. A Tyr foszfatázok közé tartoznak a fehérje Tyr foszfatázok (PTP), a kettős specificitású foszfatázok (DSP) és a kis molekulású foszfatázok (LMW). A Ser/Thr foszfatázokhoz sorolható a fémfüggő fehérje foszfatázok (PPM), a foszfofehérje foszfatázok (PPP) és az aszparaginsav alapú foszfatázok (HAD és FCP/SCP foszfatázok).

A Tyr foszfatázok közé tartoznak a fehérje Tyr foszfatázok (angolul protein tyrosine phosphatase, PTP). Az emberi genom 100 PTP-t kódol, amelyeknek szerepe van a növekedésben és a migrációban a Ras/Raf/MEK/ERK, illetve a PI3K/Akt szignalizációs útvonalak résztvevőinek szabályozásával (15). Elősegíti a T sejtek differenciációját azáltal, hogy szabályozza a T sejt progenitorok expresszióját a STAT5 fehérje defoszforilációja révén (16). Ebbe a csoportba tartoznak még a kis molekula tömegű fehérje Tyr foszfatázok (angolul: low molecular weight protein tyrosine phosphatase, LMW-PTP), amelyek főleg a növekedési faktor által kiváltott sejtosztódás szabályozásában vesznek részt, azáltal, hogy defoszforilálják és aktiválják a PDGF-R növekedési faktort, valamint a RhoGAP defoszforilációja révén szabályozzák a citoskeleton átszerveződését (17). A szakirodalom ide sorolja még a kettős specificitású foszfatázokat is (angolul: dual specificity phosphatase, DSP) annak ellenére, hogy ezek az enzimek képesek mind tirozin, mind pedig szerin aminosav defoszforilációjára. Az ide tartozó MKP-8 foszfatáz túltermelése a p38 fehérje inaktivációját eredményezi, ami egér embriókban apoptózist idéz elő (18). A JNK fehérje MKP-5 foszfatáz általi defoszforilációja veleszületett immunválaszt vált ki (18).

A Ser/Thr foszfatázok közé tartoznak a fémfüggő fehérje foszfatázok (angolul: metal dependent protein phosphatase, PPM), a foszfofehérje foszfatázok (angolul:

phosphoprotein phosphatase, PPP) és az aszparaginsav alapú foszfatázok (angolul: halocid dehidrogenase, HAD; angolul: formin capping protein/ supervisor of chromosome condensation-like phosphatase, FCP/SCP) (12). A PPM-ek nem rendelkeznek külön szabályozó alegységekkel, hanem katalitikus alegységük monomerként funkcionál, szubsztrátum specificitásukat pedig az egyes doménjeik biztosítják (12). Ide sorolhatók a PP2C és a piruvát dehidrogenáz foszfatázok (19). A PP2C-nek szerepe van a stressz aktivált fehérje kinázok által szabályozott jelátviteli útvonalak inaktiválásában azáltal, hogy defoszforilálja a MKK kinázokat (angolul: mitogen activated protein kinase kinase), valamint az apoptózis gátlásában, ahol az ASK1 kináz (angolul: apoptosis signal-regulating kinase 1) defoszforilációja révén megakadályozza a sejtek mitokondrium függő apoptózist, valamint a PP2C a p85 fehérje defoszforilációja által az adipocitákban szabályozza az inzulin érzékelést (20). A piruvát dehidrogenáz foszfatáznak szerepe van a piruvát dehidrogenáz komplex aktiválásában, ami aerob körülmények között dekarboxilálja a piruvátot, ami így a glikolízisbe lép (19).

Az FCP/SCP és a HAD csoport tagjai esetében a defoszforilációban a DxDxT (ahol D-aszparaginsav, x-bármilyen aminosav, T-treonin) motívum aszparaginsavjai vesznek részt. Az FCD/SCP csoport egyetlen ismert szubsztrátuma az RNS polimeráz II C-terminálisa, melynek foszforilált-defoszforilált állapota befolyásolja a polimeráz általi transzkripció sebességét (12). A HAD családba tartozó foszfatázoknak nagy szerepe van a szénhidrát anyagcserében, ismert szubsztrátumaik a glükóz-6-foszfát, a fruktóz-6-foszfát és a mannóz-6-foszfát (21).

A foszfofehérje foszfatázok (PPP) egy nagyfokú konzerváltságot mutató foszfatáz család, amely tagjai a sejtben két vagy három alegységű holoenzimeket alkotnak és a lejátszódó defoszforilációs események 80%-áért felelősek (7). Ide tartoznak a PP1, PP2A, PP2B (ismertebb nevén kalcineurin), PP4, PP5, PP6 és PP7 foszfatázok (12).

A PP1 az eukarióta sejtek legabundánsabb foszfatáza. A mitózis során a profázisban a Greatwall kináz foszforilálja és ezáltal inaktiválja a foszfatázt. A metafázis-anafázis átmentekor a PP1 defoszforilálja önmagát, majd a PP2A-B55 és PP2A-B56 komplexet, ami lehetővé teszi több száz mitotikus foszfofehérje defoszforilálását és a mitózis befejezését (22). Szerepe van a stresszválaszban azáltal, hogy defoszforilálja az eIF2 α transzkripciót inicializáló fehérjét, ami szükséges ahhoz, hogy a stressz megszűnése után a fehérjeszintézis elinduljon és ezáltal a sejt visszatérjen a normál sejtciklusba (23,24). Emellett a PP1 foszfatáznak szerepe van a DNS hibajavításban, amit

részletesen a későbbiekben tárgyalok. Ezen szerepek betöltéséhez széles szubsztrátum specificitással kell rendelkeznie, melyet az eddig azonosított több mint 100 regulátor alegységgel alkotott különböző holoenzim komplexei tesznek lehetővé (22).

A PP2B egy katalitikus alegységből (Kalcineurin A) és egy regulátor alegységből (Kalcineurin B) áll (12). Szerepe van számos kalcium-függő élettani folyamatban, mint például az idegrendszer normál működése: az NMDA (N-methyl-D-aspartate) és AMPA (Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) glutamát receptorokat defoszforilálja, amelyeknek ezáltal csökken az aktivitása. A receptoroknak szerepe van két idegsejt közti hosszan tartó szinapszis létrehozásában, ezáltal a tanulás és a memória kialakításában (25,26). A PP2B-nek fontos szerepe van az izomfejlődésben, itt defoszforilálja az NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) és MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) transzkripciós és az IGF-1 növekedési faktort elősegítve olyan gének expresszióját, amelyek az izomfejlődéshez, -differentiációhoz és -adaptációhoz szükségesek (27).

A PP2A fontos szerepet játszik a sejtciklusban. A PP2A a G2 fázisban nagy aktivitást mutat, részt vesz többek közt a DNS hibajavításban (28). Ezt követően a Greatwall kináz inaktíválja a foszfatázt, ami ahhoz szükséges, hogy a sejt belépjen a mitózisba. A metafázis-anafázis átmenetkor a PP1 foszfatáz fogja újra aktiválni a PP2A-t, így az defoszforilálja a CDK és az Aurora B kináz szubsztrátumait (29) Emellett a PP2A-nak szerepe van az egyedfejlődésben, egerekben kimutatták, hogy szükséges a szív és a csontok fejlődéséhez. Hiánya embrió letalitással jár (29). Szabályozó alegységeit négy családra oszthatjuk, amelyekkel a katalitikus alegység sokféle holoenzimet képezhet: B (B55 vagy PR55), B' (B56 vagy PR61), B'' (PR48/PR72/PR130), és B''' (PR93/PR110) (29,30).

A PP2A-ra nagyban hasonlít a PP4 és a PP6 enzim, mind szerkezeti, mind pedig funkciót tekintve. A PP4 katalitikus alegysége 65 %-ban megegyezik a PP2A α és a PP2A β alegységekkel, valamint 45 %-ban azonos a PP1 katalitikus alegységének izoformáival. A 35 kDa-os katalitikus alegység akárcsak a PP2A katalitikus alegysége érzékeny az okadainsavra és a mikrocisztrinre (31). A PP4 közreműködik többek közt az apoptózis gátlásában, ahol csökkenti a DR4 (death receptor 4) kifejeződését és defoszforilálja a DBC1-et (Deleted in Breast Cancer-1) (32). A PP4 részt vesz a T sejtek aktiválásában, differentiációjában és proliferációjában azáltal, hogy számos citokinin (például IL-2, TNF- α), kemokinin (például IL-8) és anti-apoptotikus molekula (például

Bcl-2) kifejeződését szabályozza (32). A PP4 a glükóz metabolizmus során aktiválja a JNK fehérjét, ami által csökken a IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) szintje és a meglévő fehérjének nő a foszforiláltsági állapota, ami végső soron inzulin rezisztenciához vezet (32) A PP4 megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt és intenzív festődést mutat a centroszómánál (31).

Emberben csak egy PP6 katalitikus alegységet kódoló gén van jelen, ami a regulátor alegységeivel alkotott holoenzimként szerepet játszik a sejtciklusban, ahol gátolja a Ciklin D1 expresszióját, defoszforilálja az Aurora A kinázt és a CK2 kináz (casein kináz-2) szubsztrátumait, mint például a condensin I-et (33). PP6 gátlás esetén lassabban történik meg a G1-S fázis átmenet és később a sejtek megakadnak az S fázisban. A PP6 foszfataz defoszforilálja és aktiválja a DNA-PK-át (DNS-függő fehérje kináz), aminek szerepe van a kettősszalú DNS törés javításában a NHEJ során (33). A PP6 növényeknél részt vesz a gyökérnövekedés és a virágzás szabályozásában (14). A PP6 képes a bZIP transzkripciós faktort defoszforilálni, ami az ABA (abszcizinsav) érzékelését lehetővé tevő gének expresszióját szabályozza. PP6 túltermeléskor csökken az ABA érzékenység, míg hiányában a gyökér sejtek ABA hiperszenzitívek lesznek, ami a gyökér növekedését gátolja. Emellett egy másik növényi hormon, az auxin érzékelését is befolyásolja azáltal, hogy a PIN auxin csatornák elhelyezkedését irányítja a sejtben és ezáltal a virágzást szabályozza (14).

Míg a legtöbb PPP több alegységes holoenzimként épül fel, addig a PP5 monomer, vagyis katalitikus és szabályozó doménje mind ugyanazon fehérje része. Szerepe van a sejt növekedésben és differenciációjában a MAPK útvonal tagjainak: Rac GTPáz, Rad és ASK1 fehérjék defoszforilációja révén. A sejtciklus esetében kimutatták, hogy PP5 hiányában a p53 fehérje hiperfoszforilált, valamint fizikai kölcsönhatásba lép az APC (Anaphase-promoting complex) komplex tagjaival a CDC16 és a CDC27 fehérjékkel, valamint csoportunk kimutatta, hogy defoszforilálja a Plk4 kinázt (Polo-like kinase 4) (2). Szerepe ismert a DNS hibajavításban, ahol az ATM és ATR kinázok aktivitását csökkenti, valamint a transzkripció során befolyásolja a HSF1 (heat shock factor 1), az ösztrogén és a glükokortikoid receptorok által szabályozott gének átírását (34).

A PP7 kevésbé ismert, eddig főleg növényi modellorganizmusokban vizsgálták és mutatták ki szerepét a fitokróm jelátviteli utakban, ahol magát a fitokrómot vagy a kriptokrómot defoszforilálhatja, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek (35). Emberben a retinában és retinoblasztóma sejtekben sikerült kimutatni az expresszióját, valószínűleg itt a foszforeceptorok szabályozásában van szerepe (36).

A PPM család tagjai mangánion- vagy magnéziumion-függő foszfatázok, ez a PPP foszfatázok közül csak a PP2B-re jellemző (12). Ami viszont közös a két foszfatáz családban, hogy a defoszforilációs reakcióban kulcsfontosságú szerepet játszik két fémion, amelyeknek feladata a vízmolekula aktiválása. Ehhez a HAD és a FCP/SCP csoport tagjai egy aszparaginsav-oldalláncot használnak a katalízishez (12).

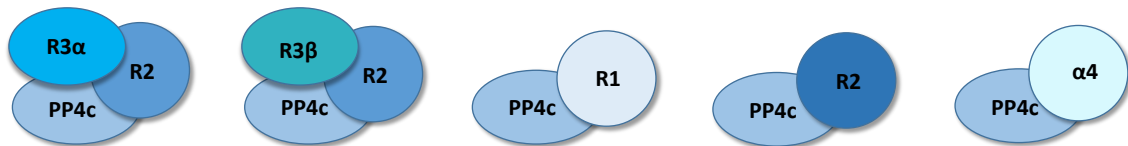
1.3. A foszfofehérje foszfatázok (PPP) felépítése és célfehérje-kötő mechanizmusuk

A foszfofehérje foszfatázok a fémion-függő fehérje foszfatázok csoportjába tartoznak, mert a katalitikus alegységük felépítésében két fémion vesz részt: Mn^{2+} és Fe^{2+} , vagy Zn^{2+} és Fe^{3+} , vagy két Mn^{2+} . A két fémiont három hisztidin oldallánc, két aszparaginsav és egy aszparagin köti be a katalitikus zsebbe. A fémionok képesek egy vízmolekula megkötésére és aktiválására, ami egy nukleofil támadást eredményez a foszforilált fehérje foszfor csoportja ellen (37,38).

A PPP foszfatázok rövid lineáris konszenzus motívumokat (angolul: short linear motifs, SLiM) ismernek fel és kötnek meg az interakciós partner fehérjéken (illetve a szubsztrátumokon). A motívumok az evolúció során spontán mutációk, inszerciók és deléciók révén jöttek létre (39). A PPP-k felismerő motívumaik többnyire az interakciós partner fehérjék gyorsan evolválódó rendezetlen régióiban fordulnak elő, és az evolúciós folyamatok során a motívum és a kötő zseb együttes változása hozta létre a motívum-kötő felületet (39). A PP1 katalitikus alegység esetében ez a kötő motívum a RVxF (ahol R-arginin, V-valin, x-bármilyen aminosav, F-fenilalanin) szekvencia, amelyet több száz interakciós partnere tartalmaz (40–42). A PP2A szubsztrátumok kötéséért a PP2A regulátor alegységei felelősek, amelyek közül a B56 az LxxIxEx/LSPIxE (ahol L-leucin, x-bármilyen aminosav, I- izoleucin, E- glutaminsav, S-szerin és P-prolin) szekvenciákat kötik meg (43,44). A PP2B esetében, akárcsak a PP1-nél, szintén a katalitikus alegység felelős a szubsztrátum kötéséért, ami LxVP és PxIxIT (ahol L-leucin, V-valin, P-prolin, x-bármilyen aminosav, I-izoleucin és T-treonin) szekvenciát ismer fel (45–47).

1.4. A PP4 foszfatáz felépítése

A PP4-ről is ismert, hogy a katalitikus alegység sokféle holoenzim komplexet hozhat létre a regulátor alegységekkel. Öt regulátor alegysége ismert: R1 és R2 (állványzat alegység), R3 (*Drosophila melanogaster*-ben Falafel (Flfl), emberben R3A (R3 α) és R3B (R3 β) izoformák), R4 és α 4 (3. ábra). A leggyakoribb holoenzim komplex a PP4c-R2-R3A vagy PP4c-R2-R3B, amelynek szerepe van a replikáció során a DNS károsodások markerének, a γ H2AX-nek a defoszforilációjában (48). Ez a holoenzim befolyásolja még a transzkripciót azáltal, hogy például tápanyaghiánykor defoszforilálja a Maf1-et (RNA polymerase III transcription repressor Maf1), ami így kötődik az RNS polimeráz III-hoz és leállítja a transzkripciót (49). A sejtciklus során defoszforilálja a BAF-ot (Barrier to Autointegration Factor), ami befolyásolja a fehérje kromatinhoz és a magmembránhoz való kötődését (50). DNS kettősszálú törésnél defoszforilálja a KAP-1-et (KRAB-associated protein 1) és 53BP1-et (p53-binding protein 1), amivel befolyásolja a fehérjéknek a DNS károsodás helyére való lokalizációját és funkcióját (51,52). Eddig az R3A és az R3B között nem tudtak interakciót kimutatni (48).



3. ábra. A PP4 lehetséges holoenzim komplexekének sematikus képe. A PP4 enzim a sejtekben alkothat heterodimer (PP4c-R1, PP4c-R4, PP4c- α 4) vagy heterotrimer (PP4c-R2-R3A(R3 α) és PP4c-R2-R3B(R3 β)) komplexeket.

A PP4c alkothat két alegységes holoenzimet (heterodimert) a PP4R1 alegységgel, amelynek *Caenorhabditis elegans*-ban a meiózisban a MEI-1 (meiotic spindle formation protein 1) fehérje degradációját szabályozza. A MEI-1 felelős a meiózis során az orsófonalak kialakulásáért, az orsófonalak lebomlásához a fehérjének is le kell bomlania a meiózis befejezéséhez (53). Az R1 alegységnek szerepe van a szignál transzdukciós folyamatokban, ahol a TRAF1, TRAF2, TRAF6 fehérjék révén gátolja az NF- κ B szignálút vonalat (54).

Egy másik heterodimer komplex az R4 alegységgel (KIAA1622) jön létre, ez a komplex *in vitro* kísérletekben kevésbé bizonyult aktívnak, mint a többi ismert

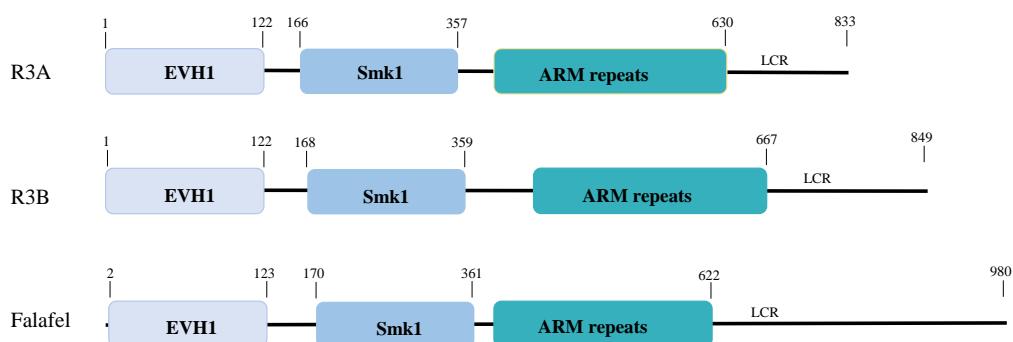
holoenzim, de ezt okozhatja az a tény is, hogy még egyetlen specifikus szubsztrátumát sem azonosították, így a teszteket más holoenzimek szubsztrátumaival végezték el (55). Immortalizált sejtvonalakban a citoszolban található, valamint kimutatták azt, hogy egerek esetében főleg az agyban dúsul fel, így feltételezhető, hogy ennek a komplexnek szövetspecifikus szerepe van és a kognitív folyamatokban vesz részt (55).

A fentiek mellett a katalitikus és a regulátor alegységek még több különböző holoenzim komplexet hozhatnak létre. A PP4c két alegységes holoenzimet alkothat a PP4R2-vel, melynek szintén DNS hibajavításban van szerepe, részt vesz a RPA2, illetve a DBC1 fehérjék defoszforilációjában (56,57). Vázizomból és tesztiszból pedig már tisztítottak egy 450 és egy 600 kDa-os komplexet, amit a PP4c és a PP4R2 aszimmetrikus eloszlása ad (58).

A fentiek mellett, nagyon fontos szerepet kap az $\alpha 4$ alegység (*Sacharomyces cerevisiae*-ben Tap42), ami a PP2A-típusú foszfatázok nem-kanonikus szabályozója. Az $\alpha 4$ fizikai kölcsönhatásba lép a foszfatázok katalitikus alegységével, ami *in vitro* befolyásolja a foszfatáz expresszióját és aktivitását. Emellett kimutatták, hogy számos ráktípusban abundánsan expresszálódik (59–61).

1.4.1. Az R3 alegység felépítése

Az R3 fehérje N-terminálisán egy 122 aminosavból álló ún. EVH1 (Enabled (Ena)/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) homology 1) domén található (4. ábra). Az EVH1 domént elsőként az Ena és a VASP fehérjékben írták le, a szubsztrátum felismerésében és kötésében van szerepe. Az EVH1 domént követi egy Smk1 vagy R3 központi domén (R3-like central domain), ami csak az R3 ortológjaiban fordul elő és az EVH1 doménhoz hasonlóan nagyfokú konzerváltságot mutat. Csoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy ez a domén is részt vesz az EVH1-től függetlenül a szubsztrátumok megkötésében, azonban a felismerési szekvenciája ismeretlen (62). A fehérje középső részén különböző hosszúságban Armadillo ismétlődések találhatóak, ezek körülbelül 42 aminosav hosszúságú tandem ismétlődések és szerepet játszhatnak az intermolekuláris kölcsönhatások kialakításában (63). Végül pedig az R3 alegységek az egyes fajok közt eltérő hosszúságú rendezetlen C-terminális részben végződnek.



- 4. ábra. A PP4R3 alegységek sematikus domén szerkezete.** A fehérje N-terminálisán található a 122 aminosav hosszúságú EVH1 domén, ezt követi egy hasonló méretű Smk1 domén. A fehérje közepén van néhány Armadillo ismétlődés, végül pedig egy változó hosszúságú rendezetlen C-terminális rész.

1.4.2. Az EVH1 domének jelentősége

Ahogy a fentiekben említettem, az EVH1 doméneket elsőként az Ena/Vasp fehérjékben írták le. Jelenleg négy fehérje családot ismerünk, amelyek ezt a domént hordozzák. Minden esetben a szubsztrátum felismerésében és kötésében van szerepe. Az Ena/Vasp családba tartozó fehérjék ún. prolinban gazdag motívumokat ismernek fel és kötnek meg alacsony affinitással. Ilyen pl. az FPPPP, amelynek konszenzus szekvenciája az FPxΦP (ahol F-fenilalanin, Φ-bármilyen hidrofób aminosav, x-bármilyen aminosav lehet és P-prolin) (64). Az ide tartozó fehérjéknek elsősorban az aktin filamentumok szerveződésében van szerepe. A második család a WASP fehérjék családja, amelyeknek a citoskeleton szerveződésében van szerepe. Az is ismert, hogy részt vesznek a hosszútávú memória kialakulásában. A WASP-EVH1 domén egy hosszabb poliprolin (több prolinból álló) motívumot ismer fel. A harmadik osztály képviselői a Homer fehérjék, amelyek nagy mennyiségben vannak jelen az idegszövetben és szintén a memória kialakításában vesznek részt. A Homer-EVH1 domén felismerési szekvenciája PPxxF. A negyedik családba tartozó SPRED a legkevésbé jellemzett EVH1 domént tartalmazó fehérje, melynek felismerési szekvenciája nem ismert, de szerkezete alapján azt feltételezik, hogy kevésbé prolin gazdag szekvenciákat ismer fel. A fehérje kiütése egerekben a hypochondroplasia tüneteirehöz hasonló tüneteket okozott (65–67).

Összességében elmondható, hogy az EVH1 domének kis affinitással, de nagy specificitással prolinban gazdag szekvenciákat ismernek fel. A kis affinitás lehetővé teszi a kötés gyors kialakítását a domén és interakciós partnere közt. A kötéshez egy hidrofób zseb szükséges, amit egy három aminosavból álló klaszter (Tyr16 (vagy Ile16 Homer-

ben), Trp23 és Phe79) alakít ki. A létrejött zsebbe hatékonyan be tud kapcsolódni a ligand prolin aminosava (66).

Amikor megvizsgáltuk a *Drosophila melanogaster* PP4 R3 alegységének EVH1 doménjének aminosav szekvenciáját két fő különbséget fedeztünk fel a kanonikus EVH1 doménekhez képest. Egyrészt, az R3 (Falafel) EVH1 doménje hidrofób zsebet, a fehérje kristályszerkezete alapján, három aminosav, a tirozin és a triptofán mellett egy leucin hozza létre (62,63). Megvizsgálva más fajokban az R3 alegységet kimutattuk, hogy ez a leucin aminosav konzerváltságot mutat, valamint, hogy a leucin alaninra történő cseréjekor a domén elveszíti interakciós partnereinek kötési képességét (62). Másrészt, amikor megvizsgáltuk az R3-EVH1 két ismert interakciós partnerét (Cenp-C és Miranda), akkor kiderült, hogy nem tartalmazzák a kanonikus EVH1 domének felismerési motívumaira jellemző prolinban gazdag szekvenciákat (63,68). Továbbá, korábbi kutatások kimutatták, hogy a Cenp-C esetében a PP4R3-EVH1 specifikusan köti az FKKP motívumot, amelyhez nélkülözhetetlen az F és a P jelenléte (63). További kísérleteinkben fény derült arra, hogy ecetmuslicában a PP4R3-EVH1 domén FxxP, illetve MxPP motívumokat ismer fel (62). Ezekhez hasonló megfigyeléseket írt le egy dán kutatócsoport emberi sejtekben (69). Következésképpen megállapítást nyert, hogy a PP4R3 alegység nem-kanonikus EVH1 doménjének konszenzus felismerési motívumai az FxxP és MxPP motívumok (ahol F-fenilalanin, x-bármilyen aminosav, M-metionin és P-prolin) (69).

1.5. A DNS hibajavító mechanizmusok

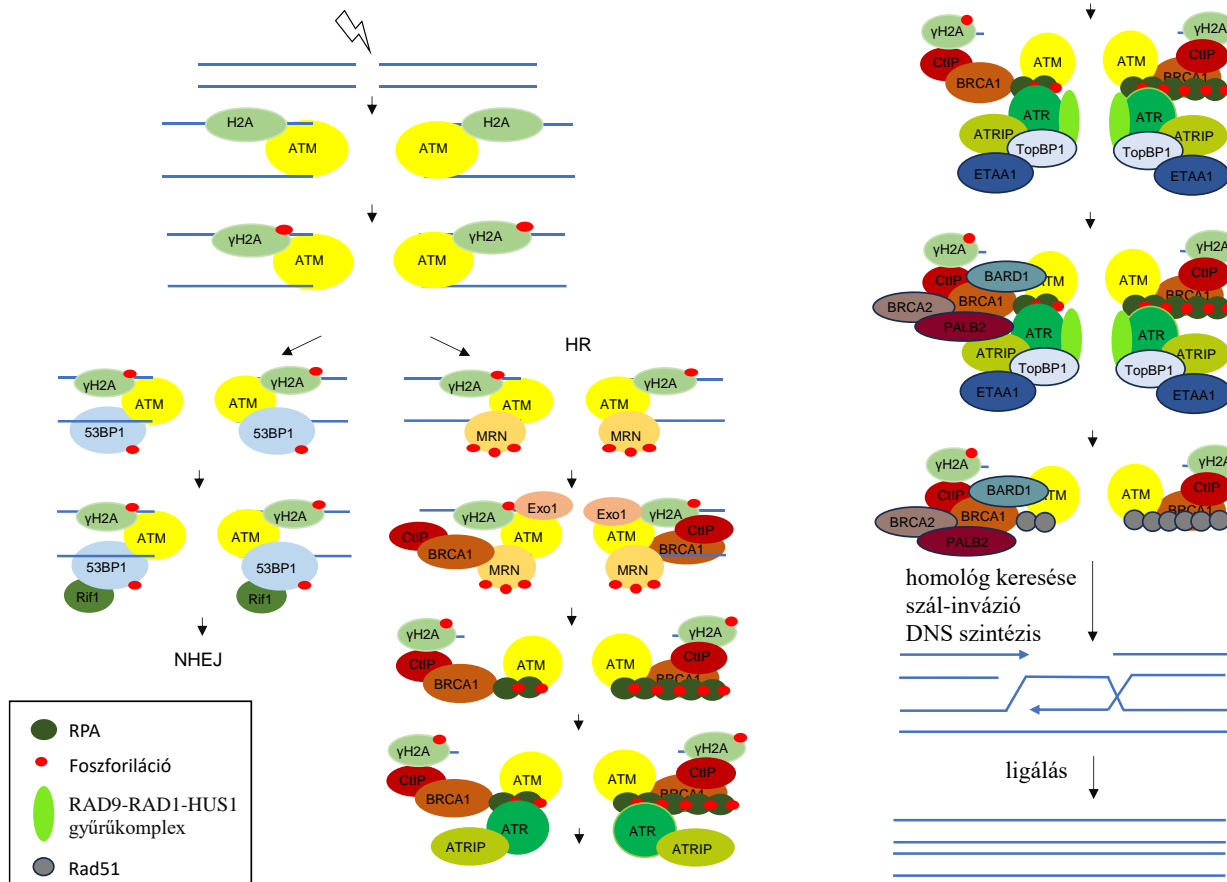
Egy emberi sejtben körülbelül 10^5 -en DNS károsodás keletkezik naponta. A DNS károsító ágensek lehetnek endogén eredetűek, ilyen például a szervezet biokémiai folyamatai során keletkező reaktív oxigén gyökök (ROS) vagy a DNS replikáció és rekombináció során létrejövő léziók. A károsító ágensek másik nagy csoportja exogén eredetű, mint például az ultraibolya (UV) és ionizáló (IR) sugárzás okozta károsodások (70). Mindkét fajta károsodás különböző DNS károsodást okoz, amelyeknek a nem megfelelő korrigálása betegségek kialakulásához vezethet, éppen ezért javításukra szervezetünk számos válaszmechanizmust fejlesztett ki. Ezt összességében DNS károsodás sejtválasznak nevezzük (angolul: DNA Damage Response, DDR), ami magába foglalja a DNS károsodás érzékelését, annak szignalizációját, a sejtciklus leállítását, hogy a sejt ne tudja a hibát tovább örökíteni, majd magát a DNS hibajavítást, végül pedig, ha a

hibajavítás nem történik meg, a sejt az apoptózist iránt köteleződik el, ha sikerül kijavítani a károsodást, akkor a sejt visszatér a normál sejtciklusba (71,72). A kettősszalú DNS törést a sejt homológ rekombinációs repair (HR) vagy nem homológ-vég illesztés mechanizmussal (NHEJ) javítja (5. ábra) (70,73). NHEJ során a két DNS vég összekötődik, míg HR esetében a testvér kromatidát mintaként használva történik meg a hibajavítás (71).

A DNS kettősszalú törést a foszfatidil-inozitol-3-kináz szerű fehérje kinázok (angolul: phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase, PIKK) családjába tartozó Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) kináz érzékeli, ami foszforilálja a H2A hisztont a 139-es szerin aminosavon, ezt a módosított formát γ H2AX-nek nevezünk (71). A foszforilációs esemény pozitív visszacsatolásként hat az ATM kinázra, ami így további fehérjéket foszforilál. Ha a foszforiláció mellett a γ H2AX metilálódik és ubiquitilálódik, akkor lehetővé válik az 53BP1 kötése, majd az ATM általi foszforilációja, ami a hiba helyére toborozza a RIF1 fehérjét. Ez jelként szolgál további fehérjék toborzására, valamint a DNS szál reszekciójának gátlására, így a sejt a NHEJ segítségével javítja a károsodott DNS-t (74,75). A HR repair során az ATM a hiba helyére toborozza és foszforilálja az MRN komplex tagjait (MRE11-RAD50-NBS1), ez elősegíti a BRCA1, CtIP és az Exo1 foszforilációját (74). Az Mre11 és az Exo1 exonukleáz aktivitásának köszönhetően létrehoz egy 3' túlnyúló DNS véget (76,77). Ezt követően az egyes szálú DNS-hez (ssDNA) az RPA fehérjekomplex (RPA70-RPA32-RPA14) kötődik, amihez szükséges a RPA32 fehérje ATM kináz általi foszforilációja (78). Az RPA komplexnek emellett, hogy védi a DNS-t a nukleázoktól, az a szerepe, hogy fizikai kölcsönhatásba lép az ATRIP-el odakötve az ATR-ATRIP komplexet (79–81). Az ATR kináz aktiválásához viszont további aktivátor fehérjékre van szükség, mint a RAD9-RAD1-HUS1 gyűrűkomplex, a TopBP1 és az ETAA1 (73,82,83). Ezt követően a ATR kináz foszforilálja a Chk2/RAD53 kinázt, ami majd további fehérjéket foszforilál (84). Végző soron a DNS szálak kicserélését és ezáltal a DNS hibajavítást a RAD51 rekombináz végzi (85). Emberben a BRCA2 mediátor fehérje toborozza a RAD51-et az RPA fehérje komplex-el bevont DNS-hez (86). A BRCA2 képes csökkenteni az RPA affinitását a DNS-hez és stimulálni elmozdulását, valamint megkötni és stabilizálni a RAD51 fehérjét és elősegíteni a fehérje DNS kötését is (87–89). A BRCA2 és az RAD51 közötti interakció foszforiláció függő, a foszforiláció megakadályozza a kölcsönhatást (90). A BRCA2 interakciós partner fehérjei a PALB2, a BRCA1 és a BARD1 szintén megkötik

a RAD51 fehérjét, ami elősegíti a DNS homológ szakaszok keresését és az ún. Holliday junction struktúrák stabilizálását és a szálcserét (91,92).

A fent leírtak alapján kijelenthetjük, hogy a homológ rekombinációban több Ser/Thr kináz vesz részt. Az ATM, az ATR, a Chk1 és Chk2 kinázok által több mint 700 fehérje foszforilálódik egérben és emberben a DNS károsodásra válaszolva (93). Az elmúlt években az is nyilvánvalóvá vált, hogy a DNS hibajavítás során a fehérjeműködés finomhangolásában, valamint a javítást követően a jelek megszüntetésében esszenciális szerepet kapnak a Ser/Thr foszfatázok is.



5. ábra. A DNS hibajavítás sematikus képe. A DNS kettős szálú törést elsőként az ATM kináz érzékeli, ami foszforilálja a H2A hisztont (γ H2AX). Ez lehetővé teszi további fehérjék toborzását. Ha az ATM foszforilálja az 53BP1-et, az oda toborozza a RIF1-et és a sejt a nem homológ végillesztés mechanizmusa (NHEJ) iránt köteleződik el. Ha az ATM a MRN komplex tagjait toborozza és foszforilálja (HR mechanizmus), az további fehérjék révén a DNS szál visszaemésztését indukálja és az egyes szálú DNS-hez az RPA komplex tagjai kötődnek. Az RPA köti az ATRIP-ATR komplexet, ami aktiválódás után elősegíti az RPA komplex cseréjét RAD51-re a BRCA2, BRCA1, PALB2, BARD1 fehérjék által. Végül a RAD51 elvégzi a rekombinációt.

1.6. A foszfatázok szerepe a DNS hibajavításban

A foszfatázok részt vesznek mind a DDR aktiválásában mind annak inaktiválásában és a sejt visszatérésében a normál sejtciklushoz. A fent említett kinázok mellett a DNS hibajavításban öt foszfatáz vesz részt: PP1, PP2A, PP2C, PP4 és a Cdc14 (28). Az első arra utaló tény, hogy a PPP foszfatázoknak szerepe van a DNS hibajavítást követően a sejt normál ciklusba való visszatérésében *Schizosaccharomyces pombe*-ben találták, ahol a Chk1 korai defoszforilációja miatt a PP1 túltermelő sejtek hamarabb visszatértek a mitózisba, mint a kontroll csoporthoz tartozó sejtek, még a hibák kijavítása előtt (94). Ma már tudjuk, hogy replikációs stressz után a PP1 elengedhetetlen a γ H2AX és a RAD53 defoszforilációjához (95). A p53 aktivitása is a PP1-től függ, a defoszforiláció csökkenti az aktivitást (96). Röntgensugárzással kezelt sejtekben a kettősszalú törés kijavításakor végbemenő homológ rekombináció végén a PP1 defoszforilálja a BRCA1-et (97).

A másik jelentős foszfatáz a PP2A, melynek kiemelt szerepe van a G2/M átmenet irányításában és a DNS hibajavításban (98,99). A foszfatáz hiányában az élesztő sejtek túl korán lépnek be a mitózisba (100). Az ATM kináz autofoszforilációja megnő PP2A hiányában röntgensugárzás kezelés nélkül is, ami kihat az ATM által szabályozott Chk1 kináz aktivitására (101,102). A PP2A fontos szerepet játszik a másik kinázpáros, az ATR és a Chk2 szabályozásában is (103,104). A PP1 mellett a PP2A is szerepet játszik a p53 defoszforilációjában, röntgensugárzás kezelést követően eltávolítja a foszfát csoportot a Ser37 aminosavról. A szerin alaninra való mutációja csökkentette a p53 transzkripciós faktor aktivitását, így az apoptózis indukciója elmarad (105). Emellett a p53 Thr55 aminosavának defoszforilációja szükséges a sejt proliferáció gátlásához, valamint, ha a fehérje defoszforilációja elmarad csökken a stabilitása, hiányában kifejeződik a Bax apoptotikus fehérje és a sejt apoptotizist választja (106).

1.7. A PP4 foszfatáz szerepe a DNS hibajavításban

A PP4 jelenlétét a DNS hibajavításban először élesztőben a Psy2 (R3) regulátor alegység révén bizonyították, ahol megfigyelték, hogy UV hatására a R3 alegység stabilizálja a replikációs villát (107). Később kiderült, hogy ennél jóval többről van szó és a PP4 foszfatáz együttműködésben a PP2A foszfatázzal, fontos szerepet játszik a DNS hibajavításban, majd azt követően a normál sejtciklus helyreállításban (28).

A PP4c-R2-R3B holoenzim főként sejtmagi lokalizációt mutat, mely komplex alegységeinek kiütése a homológ rekombinációs frekvencia csökkenését okozza (48,56). Az is ismert, hogy PP4R2 alegységének eltávolítására a DNS szintézis lelassul, valamint a sejt hosszabb ideig áll a G2/M ellenőrző ponton és röntgensugárzás után nokodazol kezelés ellenére, ami megállítja a sejteket M fázisban, 35 %-kal csökken a mitotikus sejtek száma (56).

A PP2A és a PP4 átfedő szerepeire a legjobb példa a γ H2AX defoszforilációja. Exogén eredetű DNS károsodást követően a PP2A kolokalizál a γ H2AX hisztonnal és defoszforilálja azt (48). A kamptotecin (CPT) egy alkaloid, ami DNS léziókat okoz a replikáció során. Élesztőben kimutatták, hogy PP2A hiányában CPT kezelést követően a γ H2A szint magasra ugrik, de a CPT eltávolítását követően a jel teljesen megszűnik. Ezzel ellentétben PP4c csendesítéskor a CPT eltávolítását követően megmarad a bazális γ H2A szignál (48). Ez arra enged következtetni, hogy a PP4 szabályozza nem csak az exogén tényezők által okozott károsodásra megjelenő γ H2A jelet, hanem annak hiányában is jelen lévő alapszintű γ H2A defoszforilációjáért is felel. A bazális γ H2A jel megnövekedés szintén ATR függő és a DNS-replikáció okozta DNS hibák miatt alakul ki (48). A γ H2AX defoszforilációjában a PP4c katalitikus alegység mellett a PP4R2 alegysége és a PP4R3B alegysége is részt vesz. Kimutatták mind *Drosophila melanogaster*ben, mind humánban és *Saccharomyces cerevisiae*ben, hogy a H2A hiszton variáns defoszforilációja is szükséges ahhoz, hogy a károsodás kijavítását követően a sejt visszatérjen a normál sejtciklus folyamatba. A γ H2AX foszforiláció szükséges a sejtciklus ellenőrzőpont fehérjék és a DNS hibajavításban részt vevő fehérjék toborzásához a törés helyén. PP4c csendesítés esetén a replikációs hibák kijavítása lassul és a sejtek érzékenyebbek a replikáció gátlószereire. *In vitro* mind a PP4c, mind a PP2Ac defoszforilálja a γ H2AX-t dózis függő módon és a két enzim hasonló mértékű aktivitást mutat (48).

Az RPA komplex szükséges a három R mechanizmusához, vagyis a replikációhoz, a rekombinációhoz és a hibajavításhoz (repair). Hasonlóan a γ H2AX-hez az RPA2-t is mind az PP2A, mind pedig a PP4 defoszforilálja. Az RPA2-t ATM/ATR foszforilálja a Thr21 és Ser33 aminosavakon, ami szükséges a további DNS hibajavításban résztvevő fehérjék toborzásához. Ha az RPA hiperfoszforilált marad a Ser33 aminosavon (pl. a PP4 depléciójakor) akkor lassabban történik meg az RPA komplex RAD51-re való cseréje a DNS szálon és a homológ rekombinációs hibajavítás

is lassabban megy végbe (56). A hidroxürea kezelést követően csak a PP2A szükséges az RPA defoszforilációjához, ezzel ellentétben CPT kezelés és röntgensugárzás hatására a PP4c és a PP4R2 komplex kötődik az RPA2-höz. A PP4 foszfatáz depléciójakor megnövekedik a foszfo-RPA2 mennyisége. A PP4 általi RPA2 defoszforiláció szükséges a G2/M ellenőrző ponton való áthaladáshoz, a másik két RPA alegységre nincs hatással (56,108).

A RAD53 fehérjének szerepe van a replizóma stabilizálásában, szabályozza más hibajavításban részt vevő fehérjék expresszióját, valamint a replikációs villa újraindítását (111). A DNS hibajavítás során a RAD53 (humánban Chk2) nevű fehérje, a Mec1 és Tel1 (humánban ATR és ATM) a RAD53 által (auto-) foszforilálódik. A PP4c-R3 foszfatáz komplex szerepet játszik a RAD53 deaktivációjában metil-metánszulfonát kezelést követően, ami független a γ H2AX defoszforilációs eseménytől (109,110). A PP4 nem csak a RAD53-at, hanem egy foszfoproteomikai vizsgálat szerint magát a Mec1-et (ATR) is defoszforilálja a Ser1991 aminosavon (109). Ennek ellenére a PP4c, PP4R2 és PP4R3B hiánya nem zavarja sem az ATR kináz aktivitását, sem a lokalizációt és nem hat a kinázok más szubsztrátumainak foszforiláltsági állapotára sem, mint például Chk1 (ATR szubsztrátum) és p53 (48).

A PP4c szükséges a 53BP1 fehérje defoszforilációjához is, ami szükséges a RIF1 fehérje toborzásához és a folyamat a nem homológ végillesztés felé való irányításához. Az 53BP1 foszforilált állapotban nem tud kötődni a mitotikus kromatinhoz, ami mitotikus hibák megjelenését és kromoszóma vesztést eredményez. A G1 fázisban a 53BP1 defoszforiláció szükséges ahhoz, hogy a fehérje újra a kromatinhoz tudjon kötődni a DNS hiba helyén (52).

A PP4c-R2 komplex szükséges a DBC1 (deleted in breast cancer-1) defoszforilációjához, ami kell a hibajavító folyamatok leállításához és a sejtciklusba való visszatéréshez (57). Ha a defoszforilációs esemény elmarad a PP4c csendesítése miatt, akkor a p53 aktivációja fennmarad és a sejt apoptotizál (57).

A DNS hibajavításban nem csak a PP4 általi defoszforilációs események játszanak nagy szerepet, hanem magának a PP4 holoenzimnek a poszttranszlációs módosításai is befolyásolják a hibajavítás lefolyását. Oxidatív stressz hatására a PP4 interakcióba lép a SIRT1 fehérjével, ami egy acetiltranszferáz. Ez a kölcsönhatás nem hat ki a SIRT1 aktivitására, annál inkább a foszfatázéra (112). Az PP4R3-EVH1 domén 64-es lizinje (K)

szubsztrátuma a SIRT1-nek, ami nem vesz részt az EVH1 szubsztrátum kötésében, de acetilálása gátolja az interakciót és ez csökkenti a foszfatáz aktivitását, ami megnöveli a γ H2AX és a p-RPA fehérje mennyiségét (112). A K64R mutációja csökkenti a homológ rekombináció frekvenciáját. SIRT1 hiányában a foszfatáz aktivitása nő (112).

A KAP1 (KRAB-associated protein 1) fehérjét a PP4 defoszforilálja a Ser824-es aminosavon, a foszforiláció kamptotecin kezelés hatására jelenik meg a fehérjén (113).

1.8. A centroszóma és a DNS hibajavító fehérjék kapcsolata

A centroszóma az állati sejtekben megtalálható két centriólumból és az őket körülvevő centroszómális anyagból (PCM) álló sejtservecske (114). Az érett centriólumot anyainak, míg a kevésbé érettet és összetett, leány centriólumnak nevezzük. A PCM fehérjékben gazdag mátrix, amely fehérjéknek szerepe van a mikrotubulus nukleációban és kihorgonyzásában (115). A centroszóma érése az S fázisban megy végbe rendkívül szabályozott módon, sejtciklusonként egyszer. A folyamat magába foglalja a centriólumok szemikonzervatív replikációját, itt az anyai centriólum mintaként szolgál a leány centriólum képződéséhez, majd ezek elválasztását és a PCM felhalmozódását (114). A sejtosztódás során a két centroszóma a sejt két pólusa felé vándorolva elsődleges mikrotubulus szervező központként funkcionál (angolul: microtubule organizing centre, MTOC) azáltal, hogy a PCM olyan fehérjékben gazdag, mint például γ -Tubulin gyűrű komplex fehérjéi (γ -TuRC), amelyek részt vesznek a mikrotubulusok nukleációjában és szerveződésében és végső soron a kromoszómák szétválasztásában (116,117). Ha a centroszóma duplikáció nem megfelelően megy végbe, akkor a mikrotubulusok rendellenesen szerveződnek, ami genom instabilitáshoz és végső soron betegségekhez, köztük a rák kialakulásához vezethet (118).

A DNS károsodás után a hibajavításban résztvevő fehérjék megjelenésére a hiba helyén gyorsan van szükség. Az elmúlt években megvizsgálták, hogy a hibajavításban résztvevő fehérjék megjelenését vajon a DNS károsodás váltja-e ki, vagy azok más esetben is jelen vannak a DNS-en vagy máshol a sejtben. A vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy a mitózis során az ATM, ATR, Chk1, Chk2 és ATRIP jelen van a centroszómán (119). Az ATM csendesítés esetén a centroszómák nem tudnak megkettőződni. ATR kiütés esetén ennek ellenkezőjét figyelték meg, a sejtek túl sok centroszómát tartalmaztak, akár csak a BRCA1 deléciója esetén (120). Az is ismert, hogy a BRCA1 és BARD1 egy ubiquitin E3 ligázt alkot, ami ubiquitilálja a γ -Tubulin

centroszómális fehérjét. Ennek szabályozását a MRE11-RAD50-NBS1 komplex végzi (120,121). A BRCA2 gátlása a centroszóma duplikáció és a magmembrán lebomlás késését eredményezi, ami végső soron egy lassabb sejtosztódást jelent (120,122). A BRCA2 egyik interakciós partnerének, a RAD51-nek a túltermelése is hasonló fenotípust mutat (120). Kimutatták azt is, hogy egy másik, a DNS hibajavításban részt vevő kináz, a Chk1-et foszforilálja a Cdk1 mitotikus kináz, mely esemény, ha elmarad szintén időben hosszabb sejtciklust eredményez, a sejt később lép be a mitózisba a kontrollhoz képest (123).

A centroszómák megsokszorozódnak röntgensugárzás vagy hidroxürea kezelés hatására, ami többpólusú orsók kialakulásához vezet, így a kromoszómák nem megfelelően szegregálódnak ami vagy daganat képződéshez, vagy a sejt az apoptózisához vezet (124,125). Mindemellett a mikrotubulusok szerepet játszhatnak a DNS-károsodási választóvonalak aktiválásának segítségével és szabályozásában azáltal, hogy a fenti folyamatokban részt vevő fehérjék a mikrotubulusok mentén könnyen szállíthatóak a DNS-károsodás helyére (126).

1.9. A PP4 megjelenése a centroszómán

Ahogy már a fentiekben említésre került, a PP4 foszfatáznak szerepe van a DNS hibajavításban, a glükóz metabolizmusban, a T sejtes immunválaszban és az apoptózisban (32,50,63). Mindemellett kimutatták, hogy a PP4 jelenléte és aktivitása a centroszómán fontos a centroszóma éréséhez és a mikrotubulus orsó kialakulásához (127).

A PP4 katalitikus alegységéről ismert, hogy mind az interfázisban mind a mitózis első három fázisában jelen van a centroszómán (31). Szerepe van a centroszóma érésben és a mikrotubulusok nukleációjában (31). A fehérje hiányában csökken a centroszómális α -Tubulin és Aurora A fehérjék szintje, valamint PP4c gátlásakor a Plk1 (Polo-like kinase 1) mennyisége is csökken (128,129). Ezt alátámasztja, hogy a PP4c deléciója *Drosophila melanogaster* embriókban, úgynevezett *cmm* (*centrosomes minus microtubules*) szemilevális fenotípust okoz. Ezekben az állatokban hiányoznak a mitotikus magorsók vagy nem csatlakoznak a centroszómákhoz, ami végső soron mitotikus blokkot okoz, valamint csökken a γ -Tubulin mennyisége a centroszómán, ami arra enged következtetni, hogy a fehérje egy konformáció változás miatt nem tud a centroszómához kapcsolódni (130).

Ismert az is, hogy mitótikus sejtekben a PP4c katalitikus alegység mellett jelen van az R3A és R3B alegység is a centroszómán, interfázisos sejtekben pedig a sejtmagban expresszálódnak (129). Az előbbi tények alapján feltételezhető, hogy a PP4-R2-R3A/R3B holoenzim centroszómális jelenléte és DNS hibajavításban betöltött szerepe összekapcsolható.

1.10. A Centrobin fehérje centroszómális funkciója

A Centrobin (Ctb) egy leány-centriólum-specifikus fehérje, amely szükséges a centroszóma duplikációhoz és a mikrotubulusok stabilitásához. Ecetmuslicában kimutatták, hogy jelenléte az anyai centriólumon gátolja a csillók képződését, hiányában pedig a centriólum nem kettőződik meg, valamint csonka centroszómák keletkeznek, illetve, a sejt nem képes végig haladni a mitózis fázisain (125,131). Spermaticitákban megtalálható mind az anya, mind pedig a leány centriólumoknál, ami szükséges a C- és B-tubulusok kapcsolódásához és a centriólumok növekedéséhez (132). A Ctb-nek az C-terminális doménje szükséges a mikrotubulus szervező központ (MTOC) szerveződéséhez a centroszómán, de nem szükséges a fonalak meghosszabbításához (133).

A Ctb-t a sejtciklus különböző fázisaiban több kináz is foszforilálja. Plk1 általi foszforilációja révén a Ctb képes stabilizálni a mikrotubulusokat annak következtében, hogy interakció alakul ki a Ctb és az α -Tubulin között (134,135). Ezzel ellentétben a NEK2 kináz általi foszforiláció pont ellentétes hatást vált ki, az interfázisban csökken a Ctb aktivitása, a mikrotubulusok instabillá válnak (136,137). A Plk1 általi Ctb foszforiláció ahhoz is szükséges, hogy a Ctb felhalmozódjon a leány-centriólumokon, ezáltal biztosítva a molekuláris különbséget a két centriólum között (138).

1.11. A Ctb szerepe a DNS hibajavításban

A Ctb centroszómális szerepe jól ismert és jellemzett: Nemrég kimutatták, hogy a fehérje UV sugárzást követően ATR kináz-függő módon foszforilálódik és megjelenik a sejtmagi mátrixban (93,139). Depléciója pedig csökkenti a homológ rekombináció hatékonyságát, csökken a sejtek életképessége, valamint kijavítatlan DNS hibák jelentkeznek (139). Emellett egy másik tanulmányban kimutatták, hogy a Ser781 aminosav röntgensugárzás hatására foszforilálódik (93). Mindemellett a DNS károsodás

során csökken a NEK2 aktivitása, ami előidézhetheti a Ctb mikrotubulus stabilizáló hatását (137). Ezért felmerül a kérdés, hogy a Ctb más centroszómális fehérjékhez hasonlóan kettős szerepet játszik-e a centroszóma érésben és a DNS hibajavításban (139).

2. Célkitűzés

A PP4 katalitikus alegység jelenléte és szerepe a DNS hibajavításban kísérletesen bizonyított, az R3 alegység szerepét is kimutatták már a folyamatban. Korábbi munkánk során leírtuk, hogy a PP4 R3 szabályozó alegysége FxxP, illetve MxPP felismerési szekvenciákat köt (62,63). Miközben a felismerő szekvencia azonosításához újabb interakciós partnereket kerestünk, számos olyan fehérjét találtunk, amelyeknek ismert szerepe van a DNS hibajavításban. Ezek közül a Ctb fehérje keltette fel az érdeklődésünket, mert míg a szerepe jól jellemzett a centroszóma megkettőződésében és érésében, addig a DNS hibajavításban játszott szerepét csak egy tanulmányban vizsgálták (139). Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a Ctb és a PP4 kapcsolatát a DNS hibajavításban:

1. Teszteljük *in vitro* és *in vivo* kísérletekben, hogy a Ctb kötése csak egy FxxP motívumtól függ-e?
2. Megvizsgáljuk, hogy a Ctb és a PP4 holoenzim alegységeinek csendesítése hatással van-e a röntgensugárzást követően történő DNS hibajavítás kinetikájára?
3. Kimutatjuk, hogy a Ctb és a PP4 holoenzim alegységeinek deléciója hatással van-e a homológ rekombináció mechanizmusára?
4. Ellenőrizzük, hogy amennyiben a DNS hibajavítás nem megfelelően megy végbe ezen fehérjék hiányában, akkor az jár-e valamilyen fenotípusos változással a sejtekben?
5. Megvizsgáljuk a Ctb fehérje Ser781 foszfo-null és foszforilációt-mimikáló variánsainak szerepét ezekben a folyamatokban.

3. Anyagok és módszerek

3.1. DNS konstrukciók

3.1.1. Klasszikus klónozás

A humán Ctb-t kódoló pOTB7_Hs_Ctb-ról PCR reakcióban amplifikáltuk a teljes hosszúságú humán *ctb* CDS-t (Uniprot azonosító: Q8N137; cDNA név: MHS6278-202832427, klón ID: 4859539) a Függelék 1. táblázatban megadott oligonukleotid primerekkel, melyek NotI és XbaI restrikciós endonukleáz felismerőhelyet tartalmaztak. A kapott PCR termék emésztést követően könnyen ligálható volt a pFlagCMV4 (kat#E7158, Merck Millipore) vektor multiklónozó helyére a fent említett enzimekkel való hasítást követően, valamint pHY22 (140) vektorba is a NotI-EcoRV restrikciós endonukleáz felismerőhelyre. Ebben az esetben viszont az XbaI túlnyúló véget Klenow (kat#EP0051, Thermo Fisher Scientific) enzimmel feltöltöttük.

A Ctb fragmenteket szintén PCR reakcióban amplifikáltuk, a Függelék 1. táblázatban megadott oligonukleotid primerekkel, melyek EcoRI és Acc65I restrikciós enzim felismerőhelyet tartalmaztak. A kapott PCR termék restrikciós emésztést és gélből való izolálást követően ugyanezen helyekre ligálható a pFlagCMV4 vektorba. A következő Ctb fragmenteket állítottuk elő: 1-től 180-ig, 180-tól 903-ig, 1-től 460-ig és 460-tól 903 aminosavig, a fehérje másodlagos szerkezetének megbecsülése (3. Függelék) és a szakirodalom alapján (69).

A *Drosophila melanogaster* Ctb-t kódoló plazmid konstrukciókat már korábban létrehozták a csoportunkban (62).

3.1.2. Gateway klónozás

Gateway klónozás során két rekombinációs reakció játszódik le: BP és LR reakció. A gyártó útmutatóit figyelembe véve (Thermo Fisher Scientific), amplifikáltuk PCR reakcióban a teljes hosszúságú R3A (Uniprot azonosító: Q6IN85, cDNS neve: MHS6278-202759611, klón ID: 6142109), illetve R3B (Uniprot azonosító: Q5MIZ7-3, cDNA név: MHS6278-202807853; klón ID: 5259789) CDS-t, oly módon, hogy a felhasznált oligonukleotid primerek (Függelék 1. táblázat) tartalmaztak a génspecifikus szakaszon túl egy attB helyet. Ez a termék könnyen

bevihető a BP rekombinációs reakció során egy attP felismerő helyet tartalmazó donor vektorba (kat#12536017, Thermo Fisher Scientific). A rekombinációt követően az elkészült pDONR221_R3A, illetve a pDONR221_R3B plazmidokban már attL hely található, illetve itt felhasználtuk a korábban elkészített pDONR221_Flfl_EVH1, pDONR221_R3A_EVH1 plazmidokat is (62). A második reakcióban, az LR reakcióban, az attR helyekre, amit az expressziós célvektor tartalmaz, rekombinálható a fehérjét kódoló szekvencia. Egy donor vektor segítségével számos expressziós konstrukció létrehozható. Esetünkben a pDONR221_R3A, illetve a pDONR221_R3B vektorokat felhasználva az N-terminális GFP fehérjét tartalmazó pDEST53 célvektorban (kat#12288015, Thermo Fisher Scientific) létrehozható a GFP-R3A-t, illetve a GFP-R3B-t kódoló plazmid konstrukció. A pDONR221_Flfl_EVH1, a pDONR221_R3A_EVH1, a pDONR221_R3A és a pDONR221_R3B felhasználásával az N-terminális GST fehérjét tartalmazó pDEST15 célvektorban (kat#11802014, Thermo Fisher Scientific), létrehozható a GST-Flfl-EVH1-et, a GST-R3A-EVH1-et, GST-R3A-t, illetve a GST-R3B-t kódoló plazmid konstrukciók.

3.2. Helyspecifikus mutagenézis

A pFlagCMV4-Ctb-180-903 fragmentet templát segítségével a QuickChange II XL Mutagenesis Kit-et (kat#200522, Agilent Technologies) felhasználva létrehoztuk a Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-774, a Flag-Ctb-180-903aa-S781A, illetve a Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutációkat a Ctb fragmentben a 25 µl térfogatú reakciókban:

2,5 µl 10x tömény reakció puffer, 50 ng DNS templát, 125-125 ng forward és reverz irányú oligonukleotid primer, 1 µl dNTP mix, 0,5 µl Pfu Ultra polimeráz.

A PCR program a következő volt:

95 °C, 30 másodperc;

majd tizenhat ciklusban: 95 °C, 30 másodperc; 55 °C, 1 perc; 68 °C
5 perc;

68 °C, 7 perc

A program befejeztével 2 µl-t kivettünk a reakcióból, a maradékhoz hozzáadtunk 1 µl (10 U/µl) DpnI restriktív enzimet. A reakciót 3 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd 2 µl-rel *Escherichia coli* DH5α kompetens sejteket

transzformáltunk. A DpnI enzim csak a templátként használt metilált DNS-t képes emészteni, a PCR reakcióban újonnan szintetizált mutáns DNS intakt marad, így a transzformált baktériumok nagyobb valószínűséggel hordoznak megfelelő plazmid konstrukciót. Az emésztetlen 2 µl-t kontrollnak használtuk.

A létrehozott plazmid konstrukciókat minden esetben restriktációs enzimekkel, illetve ezt követően szekvencia meghatározással ellenőriztük.

A felhasznált oligonukleotid primerek az 1. Függelékben van közölve.

3.3. Rekombináns fehérjetermelés és affinitás-tisztítás

A kísérletekben használt rekombináns fehérjéket a következőképpen termeltettük és tisztítottuk: A pDEST15-R3A-EVH1, pDEST15-R3A, pDEST15-R3B és pDEST15-Fifl-EVH1 vektorokkal transzformáltuk az *Escherichia coli* SixPack sejteket (141). A baktérium kultúrát a standard protokoll szerint növesztettük Terrific Broth autóindukciós médiumban (kat#AIMTB0210, Formedium) 16 °C-on 48 óráig, majd centrifugálással leüleptítettük (5000 g, 8 perc, 4 °C-on) és a sejteket újra felszuszpendáltuk foszfáttal-pufferelt sóoldatban (PBS), majd lefagyasztottuk -80 °C-ra. Felolvasztást követően a sejtszuszpenziót kiegészítettük 0,2 mg/ml lizozimmal (kat#L6879, Sigma-Aldrich) és 1 mM PMSF-el (fenil-metil-szulfonil-fluorid, szerin proteáz gátlószer, kat#P7626, Sigma-Aldrich) és a sejteket ultrahangos roncsolással lizáltuk. A sejtörmeléket centrifugálással leüleptítettük (12000 g, 15 perc, 4 °C), a lizátumot pedig hozzáadtuk 150 µl PBS-sel equilibrált glutation-szefaróz 4B (kat#17-0756-01, Cytiva) gyöngyhöz, majd 3 órán át 4 °C-on lassan kevertettük. Ezt követően a gyöngyöket mostuk négyszer 0,05 % Triton X-100-zal kiegészített PBS-sel, majd felhasználásig 50 % glicerol tartamú PBS-ben tároltuk -20 °C-on.

3.4. *In vitro* kötési kísérletek

A Ctb variánsok és az R3A vagy R3B közötti *in vitro* kötés kimutatására ³⁵S-metioninnal jelölt radioaktív Ctb fehérjét állítottunk elő *in vitro* transzkripció és transláció rendszerrel (IVTT, kat#L1170, Promega). A 15 µl végtérfogatú reakciót a következőképpen mértük össze: 11 µl TNT T7 retikulocita lizátum (TNT Quick Master Mix, Promega), 0,33 µl proteáz inhibitor koktél (PIC, kat#11873580001,

Roche), 0,33 μ l RNáz gátlószer (RNasin, kat#N261B, Promega), 0,4 μ l MBq 35 S-L-metionin (kat#NEG709A, PerkinElmer) és 2,9 μ l víz. Hozzáadtunk 100 ng-ot a termeltetni kívánt fehérjét kódoló T7 promotert tartalmazó plazmid konstrukcióból. A reakciót 30 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd kivettünk 1 μ l-t – ez később inputként a fehérje expresszió ellenőrzésére szolgált –, a maradékot hozzáadtuk az A oldattal-equilibrált (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100), glutation-szefaróz mátrixhoz immobilizált, GST-vel fuzionált csali fehérjékhez. A gyöngyöket előtte kötőpufferben (A oldat kiegészítve EDTA-mentes 1x PIC-el és 0,5 mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA)) szuszpendáltuk fel. A csöveket 4 °C-on, lassú forgatással 2 órán keresztül kevertettük, majd mostuk kötőpufferrel, kétszer A oldattal és négyszer B oldattal (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,2 % Triton X-100). A kötődő fehérjéket 4 perc forralással 1x Laemmli pufferbe eluáltuk. A fehérjéket hagyományos Tris-Glicin alapú SDS-PAGE gélen molekulatömeg szerint elválasztottuk. A futtatáshoz a BioRad fehérje futtató készülékét használtuk a következő futtatópufferben: 25 mM Tris, 0,01 % SDS, 192 mM Glicin, pH 8,2- 8,5. A futtást követően a géleket 10 % ecetsavas fixálást követően 0,1 % Coomassie brilliant blue oldattal festettük, a felesleges festéket 10 % metanol 7% ecetsav eleggyel eltávolítottuk, majd a gélt beszkeneltük és BioRad gélszárító berendezéssel kiszárítottuk.

A 35 S-metioninnal jelölt fehérjék detektálása: A 35-ös kén izotóp egy alacsony energiájú β -sugárzó, detektálásához autoradiográfiát használtunk. Az expozíciót -80 °C-on végeztük röntgenfilmmel (Kodak), kis-energiájú erősítő fólia alkalmazása mellett (kat#1111681, Kodak). 24-48 órás expozíciót követően a filmet sötét szobában hívtuk elő, majd szárítást követően a filmet szkennelvel dokumentáltuk (140).

3.5. Sejtkultúrák fenntartása

HeLa (ATCC CRM-CCL-2), HEK293 (ATCC CRL-1573) és U2OS DR-GFP (142) sejtvonalakat 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett tartottunk fenn magas glukóz tartalmú Lonza Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM, kat#61965026, Thermo Fisher Scientific), amit 10 % magzati borjú szérummal (FBS, kat#ECS0180L, Euroclone), 1x penicillin- sztreptomocinnal (kat#XC-A4122, Biosera) és 1x nem

esszenciális aminosav (kat#BE13-114E, Lonza Group AG.) oldatokkal egészítettünk ki.

3.6. Ko-immunoprecipitáció

Az *in vivo* kötési kísérletekhez HEK293 sejteket növesztettünk 10 cm-es Petri csészében 70 %-os sejt konfluenciáig a fent leírt módon. Amikor elérték a 6×10^6 sejt számot ko-transzfektáltuk őket 2-2 plazmid konstrukcióval, mindkét plazmidból 3-3 μg -ot használtunk, 56 μl 0,4 mg/ml koncentrációs polietilénimin (PEI, cat#408727, Merck Millipore) transzfekeciós reagenst használva a gyári protokoll alapján a következő kombinációkban:

1. plazmid	2. plazmid
pDEST53	pFlagCMV4-Ctb-180-903-WT
pDEST53	pFlagCMV4-Ctb-180-903-771-ARVA-781
pDEST53	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781A
pDEST53	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781D
pDEST53-R3A	pFlagCMV4-Ctb-180-903-WT
pDEST53-R3A	pFlagCMV4-Ctb-180-903-771-ARVA-781
pDEST53-R3A	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781A
pDEST53-R3A	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781D
pDEST53-R3B	pFlagCMV4-Ctb-180-903-WT
pDEST53-R3B	pFlagCMV4-Ctb-180-903-771-ARVA-781
pDEST53-R3B	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781A
pDEST53-R3B	pFlagCMV4-Ctb-180-903-S781D

1.Táblázat. Az együtt transzfekektált plazmid konstrukciók a felhasznált kombinációkban.

A sejteket 48 órával a transzfekeció után sejtkaparóval összegyűjtöttük 1 ml PBS oldatba, lecentrifugáltuk (1000 g, 5 perc, szobahőmérsékleten), majd mostuk 1 ml PBS-sel, újra lecentrifugáltuk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejteket feltártuk 900 μl A oldatba (50 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 0,1 % NP-40, 5 % glicerin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1x EDTA-mentes PIC, 25 μM MG132 (kat#10012628, Cayman Chemical Company) és

0,1 µl/ml benzonáz/nukleáz (kat#70746-10KUN, Merck Millipore)), majd a sejtlizátumot összekevertük 7 µl A oldattal equilibrált GFP-Trap mágneses gyönggyel (kat#gtma-20, ChromoTek GmbH) és 2 órán keresztül 4 °C-on kevertettük, majd mostuk kétszer A oldattal és háromszor B oldattal (50 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,1 % NP-40, 5 % glicerin). A felkötött fehérjét 25 µl 1xLaemmli minta-pufferben 5 perc forralással eluáltuk. A fehérjék 20, illetve 80 %-át méret szerint elválasztottuk SDS-PAGE-en, a fent leírt módon, majd transzferáltuk PVDF (polivinilidén fluorid, kat#IPVH00010, Merck Millipore) membránra és western blot eljárással analizáltuk a 3.15.-ös pontban felsorolt ellenanyagokat használva.

3.7. Géncsendesítés siRNS-ek felhasználásával

A HeLa vagy U2OS sejteket 70 %-os ($8,4 \times 10^5$ sejt) sejt konfluenciáig növesztettük 6 lyukú lemezen, majd a gyártó által javasolt protokollt követve transzfektáltuk: 500 µl OptiMEM (kat#31985-047, Gibco) médiumhoz hozzáadtunk 120 pmol siRNS-t (a kettős csendesített vonalaknál 60-60 pmol). Egy másik csőbe belemértünk 8 µl Lipofectamine 2000 (kat#11668-018, Invitrogen) vagy DharmaFECT (kat#T-2022-02, GE Healthcare Dharmacon) transzfekciós reagenst. Öt perc inkubáció után a két cső tartalmát összekevertük vortex-szel, majd további 20 percig inkubáltuk, végül a transzfekciós komplexet a sejtekhez csepegtettük 4 óra múlva az OptiMEM-et lecseréltük komplett DMEM magas glükóz tartalmú médiumra. A felhasznált siRNS-ek a 2. Függelékben van közölve. A csendesíteni kívánt gének transzkriptumainak mennyiségét minden esetben qPCR és western blot technikával ellenőriztük.

3.8. γ H2AX sejtmagi fókuszok számolása

Az siRNS transzfekciót követően 24 órával a sejteket tripszin oldattal (kat#TRY-3B, Capricorn Scientific) kezeltük és fedőlemezekre szélesztettük két részre osztva, majd újabb 24 óra elteltével a sejtekhez 10 µM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) timidin bázis analógot adtunk. Az EdU egy nukleozid analóg, amely a szintézis fázisában beépül a DNS-be és kapcsolható hozzá egy fluoreszcens festék. Ezt követően az egyik mintasorozatot 2 Gray (Gy) röntgensugárzással

kezeltük, míg a másikat kezeletlenül hagytuk (kontroll). A kezelés után 2, 4 és 8 órával a fedőlemezeket 3 % paraformaldehid (PFA, kat#158127, Merck Millipore) oldattal 10 percig fixáltuk. A γ H2AX fókuszokat anti- γ H2AX elsődleges és Alexa Fluor 488 másodlagos ellenanyaggal vizualizáltuk, a DNS-t PBS-ben hígított 0,15 μ g/ml koncentrációjú Hoechst33342 (kat#H21492, Thermo Fisher Scientific) oldattal festettük, valamint hozzáadtuk az EdU-hoz kapcsolódó fluoreszcens festéket, EdU Click 555 (kat#BCK-EdU555-1, BaseClick GmbH). Lemezenként 50-50 EdU-pozitív sejtben számoltuk meg a γ H2AX fókuszokat.

3.9. A homológ rekombináció sikerességének mérése humán sejtekben

Ehhez a kísérlethez az úgynevezett DR-GFP riporter sejteket használtuk (142). Az siRNS-ekkel való transzfekciót követően 24 órával a sejteket tripszin oldattal kezeltük és fedőlemezekre szélesztettük, majd újabb 24 óra elteltével a sejteket pCBASceI (kat#26477, Addgene Watertown) plazmid konstrukcióval transzfektáltuk a fent leírt módon 8 μ l Lipofectamine 2000 (kat#11668-018, Invitrogen) transzfekciós reagenst felhasználva. 96 órával a csendesítés után a sejteket 3 % PFA oldattal fixáltuk, majd a DNS-t PBS-ben hígított 0,15 μ g/ml koncentrációjú Hoechst33342 oldattal festettük. A GFP és a Hoechst33342 jeleket Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss) mikroszkóp 20x objektívével detektáltuk, majd a GFP pozitív sejteket CellProfiler software segítségével számoltuk (143). A Hoechst33342 festés a sejtmagok (kromatin) kijelölésére szolgál, a GFP pozitív sejtek aránya pedig megbecsüli a homológ rekombináció eredményességét a különféle mintákban. Minden esetben legalább 2500 sejtet fotóztunk le és számoltattunk meg a szoftverrel.

3.10. Mitótikus kromoszóma preparálás és jellemzés humán sejtekből

24 órával az siRNS transzfekció után a sejteket két Petri csészébe osztottuk fele-fele arányban, majd újabb 24 óra elteltével az egyik Petri csészében lévő sejteket kezeltük 2 Gray röntgensugárással, míg a másik csoport kezeletlen maradt (kontroll). Ezután a sejtekhez hozzáadtunk 20 μ g/ml kaffeint (kat#C0750, Merck Millipore) és 10 μ g/ml kolhicint (kat#D00138122, Calbiochem) és tovább növesztettük 6 órán keresztül, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett (144). A kafein és a kolhicin kezelés által növeljük a metafázisos kromoszóma izolálás hatékonyságát (145). A 6 óra elteltével

a sejteket tripszin oldattal kezeltük és centrifugálással (900 g, 5 perc, szobahőmérsékleten) leüleptítettük, majd felszuszpendáltuk 75 mM KCl oldatba és 37 °C-on fél órát inkubáltuk. A sejteket újabb centrifugálással (900 g, 5 perc, RT) összegyűjtöttük és felvettük 1 ml metanol: ecetsav (3:1 arány) fixáló oldatba, a folyamatot háromszor megismételtük. Végül a sejteket felvettük 1 ml fixáló oldatba és 20-50 µl-t fedőlemezre szélesztettük. Egy éjszakán át szárítottuk, majd festettük 1 µg/ml Hoechst33342 oldattal és tárgylemezre raktuk. Mintánkként 150-150 kromoszóma csoportot fotóztunk le és számoltunk meg, majd osztályoztunk morfológiai jegyek alapján. Összetapadt kromatidájú kromoszómáknak neveztük azokat a kromoszómákat, amelyek a mitotikus X vagy V formájú kromoszómákhoz képest a kromoszóma két rövid, illetve két hosszú karja egymáshoz tapad (144–146).

3.11. Ctb csendesítés és menekítés Flag-Ctb variánsokkal

Az 1-es számú Ctb siRNS célszekvenciája (lásd 2. Függelék) a cDNS 5' végéhez közel esik, így a Flag-Ctb-180-903aa fragmentet kódoló szakaszt nem érinti. Annak vizsgálatára, hogy a vad típusú Flag-Ctb-180-903aa-WT, illetve Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-774, Flag-Ctb-180-903aa-S781A és Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutánsok képesek-e pótolni a hiányzó endogén Ctb fehérjét kettős transzfekciót végeztünk a Ctb siRNS-sel, illetve a fent felsorolt fehérjéket kódoló plazmid konstrukciókkal. A sejteket 70 %-os sejt konfluenciáig ($8,4 \times 10^5$ sejt) növesztettük 6 lyukú sejttenyésztő lemezen, majd 8 µl Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenssel bevittünk 60 pmol siRNS-t és 1500 ng-ot valamelyik Flag-Ctb-180-903aa változatot kódoló plazmid konstrukcióból. 24 órával a transzfekció után a sejteket tripszin oldattal kezeltük és szétosztottuk fele-fele arányban két Petri csészébe, újabb 24 óra elteltével az egyik Petri csészében lévő sejteket 2 Gray röntgensugárzással kezeltük, míg a másikat kezeletlenül hagytuk (kontroll), majd a fent leírt módon mitotikus kromoszómát preparáltunk. A Flag-Ctb-180-903aa variánsok kifejeződését western blottal vizsgáltuk.

3.12. Western blot kísérletek

A fehérjék detektálásához a ko-immunoprecipitációs, az siRNS csendesítés hatékonyságának ellenőrzésére és az endogén Ctb menekítés kísérletekben western

blot módszert alkalmaztunk. A fehérjéket Tris-Glicin alapú SDS-PAGE-en a molekulásúly szerint elválasztottuk, majd a BioRad Trans-Blot Semi-Dry készülékével PVDF-re membránra transzferáltuk a következő pufferben: 50 mM Tris, 40 mM Glicin, 20 % metanol és 0,04 % SDS.

A blottolás után a membrán szabad fehérjekötő felületét kezeltük 5 %-os zsírszegény tejport, TBS-t (Tris pufferelt sóoldat), 0,5 % Tween 20-t tartalmazó oldattal, 30 percig szobahőmérsékleten inkubálva. Az ellenanyagokat 1x TBST+B (1xTBS és 0,5 % Tween 20, 1 mg/ml BSA) oldatban hígítottuk, majd a membránt 3 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elsődleges ellenanyag után a membránt mostuk háromszor 10 percig 1xTBST oldattal, majd inkubáltuk TBST+B hígított tormaperoxidáz (HRP) konjugált egér elleni másodlagos ellenanyaggal a fent leírt körülmények közt 1 órán át. A membránt újra mostuk, majd Immobilon kemilumineszcens HRP szubsztrátummal inkubáltuk 5 percig (kat#WBKLS0500, Merck Millipore). A HRP által oxidált kromogén szubsztrátumát jelét Azure c300 géldokumentációs rendszerrel (Azure Biosystems) detektáltuk. A felhasznált ellenanyagokat a 3.15.-ös alpontban tárgyaljuk.

3.13. Géncsendesítés hatékonyságának ellenőrzése qPCR segítségével

A fent leírt kísérletekben minden esetben az siRNS transzfekció által kiváltott csendesítés hatékonyságát qPCR technológiával ellenőriztük. A sejtek teljes RNS tartalmát izoláltuk Zymo Research Quick-RNA MiniPrep (kat#R1054, Zymo Research) segítségével, majd egyesszálú cDNS-t készítettünk RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (kat#K1670, Thermo Fisher Scientific) felhasználásával. Végezetül, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-et (kat#K0222, Thermo Fisher Scientific) használtunk a valós idejű kvantitatív PCR-hez a gyártók megadott protokolljai alapján megfelelően megtervezett oligonukleotid primerek felhasználásával (1. Függelék). Minden minta esetében négy párhuzamos reakciót futtattunk le a Rotor-Gene Q Real-Time PCR Detection (QIAGEN) rendszerrel a következő körülmények között: 95 °C 10 perc, 40 ciklus 95 °C-on 15 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 72 °C 30 másodperc. Az ábrákon a négy párhuzamos mérés átlagának értéke és azok szórásai láthatóak (15. és 26. ábra).

3.14. Immunfluoreszcencia

A 3 %-os PFA oldattal történő fixálását követően a sejteket permeabilizáltuk 10 percig 0,5 % Triton X-100 tartalmú PBS-ben, mostuk háromszor 0,1 % Triton X-100-at tartalmazó PBS pufferrel, majd a szabad fehérjéket blokkoltuk 3 % FBS-sel kiegészített mosó pufferrel, szobahőmérsékleten 30 percig. A sejtekre ezután a blokkoló oldatba hígított elsődleges ellenanyagot raktuk és egész éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk nedves kamrában. Három újabb mosó pufferrel való mosását követően a sejteket a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal (3.15.-ös alpont) sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órát. A sejteket mostuk háromszor mosó pufferrel, majd a DNS-t 0,15 µg/ml koncentrációjú Hoechst33342 oldattal festettük 10 percig. A mikroszkópos képeket Zeiss LSM 800 mikroszkóppal készítettük.

3.15. Felhasznált ellenanyagok

A western blot és az immunfestés kísérletében a következő elsődleges ellenanyagokat használtuk a megadott hígításban: egér anti-FlagM₂ (WB: 1:10000, kat#F1804, Merck Millipore), egér anti-GFP, (WB: 1:200, kat#11814460001, Roche), egér anti- α -Tubulin (WB: 1:10000, kat#T6199, Merck Millipore), nyúl anti-Centrobilin (WB: 1:1000, kat#PA5-96990, Invitrogen), nyúl anti-R3A (WB: 1:1250, kat#PA566644, Invitrogen), nyúl anti-R3B (WB: 1:1250, kat#PA551545, Invitrogen), egér anti-PP4c (WB: 1:1000, kat#MA5-32946), nyúl anti-Flag (IF: 1:500, kat#F7425, Merck Millipore), egér anti- γ H2AX (IF: 1:500, kat#ab81299, Abcam) és egér anti- γ -Tubulin (IF: 1:300, kat#T6557, Merck Millipore). A másodlagos ellenanyagok a következők voltak: kecske anti-egér HRP-konjugált IgG ellenanyag (WB: 1:10000, kat#P044701-2, Dako), kecske anti-nyúl HRP-konjugált IgG ellenanyag (WB: 1:10,000, kat # P044801-2, Dako), szamár anti-nyúl IgG Alexa Fluor 488 konjugált (IF: 1:500, kat#A21206, Thermo Fisher Scientific), szamár anti-egér IgG Alexa Fluor 488 (IF: 1:500, kat#A21202, Thermo Fisher Scientific), szamár anti-nyúl IgG Alexa Fluor 594 (IF: 1:500, kat#A21203, Thermo Fisher Scientific).

3.16. Statisztikai elemzés

Minden kísérletet legalább háromszor végeztünk el ($n=3$). A statisztikai elemzések során az Origin Graph statisztikai szoftver segítségével (<https://www.originlab.com/origin>) egy próbás ANOVA tesztet végeztünk (147). A csillagok a P érték, regressziós együttható szignifikanciáját jelölik (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, és *** $P < 0,001$).

4. Eredmények

4.1. A PP4 foszfatáz R3 alegységének konzervált szubsztrátum-felismerő mechanizmusának vizsgálata

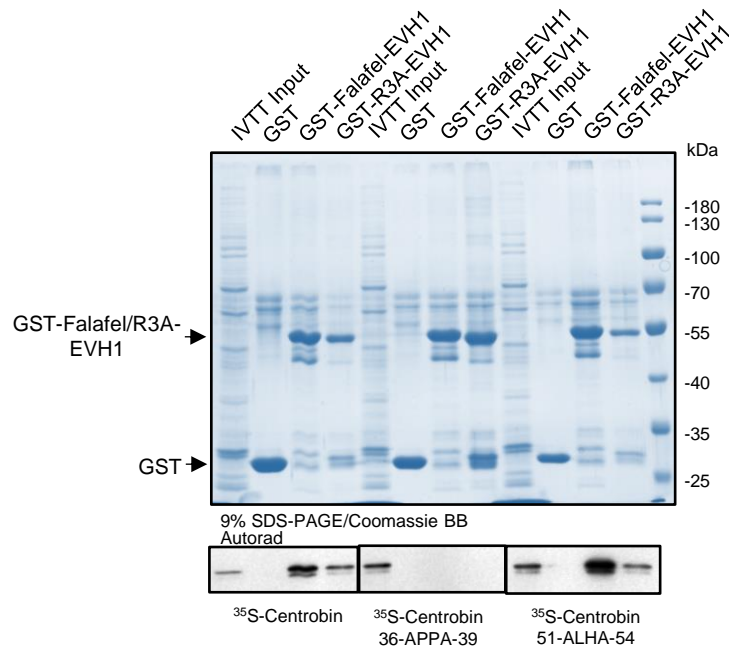
Kutatásaink során kimutattuk, hogy a Ctb fehérje specifikusan kötődik a PP4 foszfatáz R3 regulátor alegységének EVH1 doménjéhez *Drosophila melanogaster*-ben (62). Ueki és munkatársai 2019-ben megjelent tanulmányában, szintén azt találta, hogy a Ctb fehérje kötődik az R3 szabályozó alegységhez humán sejtekben is (69). Ez azért meglepő, mert a Ctb fehérjék csupán funkcionális ortológjai egymásnak és szekvencia szinten csak 39 %-ban azonosak és sem a humánban azonosított, kötéshez szükséges FRVP motívum nem található meg ecetmuslicában, sem a *Drosophila melanogaster*-ben azonosított MPPP motívum nincs meg emberben (6. ábra) (62).



6. ábra: A *Drosophila melanogaster* és a humán Ctb sematikus összehasonlítása. Míg a humán Ctb egy C-terminálison elhelyezkedő FRVP (771-FRVP-774) motívummal, addig az ecetmuslica egy N-terminálison elhelyezkedő MPPP (36-MPPP-39) motívummal kötődik az R3 alegységhez.

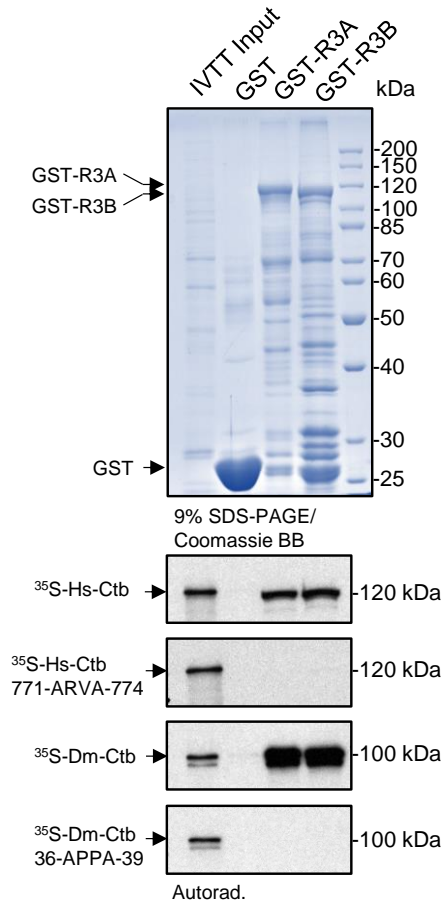
Ezért hipotézisünk az volt, hogy ha a kötési motívumok nem is, de a kölcsönhatás mechanizmusa az R3A/R3B/Falafel és a Ctb között valószínűleg nagyfokú konzerváltságot mutat. Ennek vizsgálatára helyspecifikus mutagenézis segítségével kicseréltük az ecetmuslica Ctb ismert MPPP PP4-hez kötődő motívumát Ctb-36-APPA-39-ra (50). Kontrollként a kötést nem befolyásoló FLHP motívum mutáns verzióját (Ctb-51-ALHA-54) használtuk. A fehérjéket *in vitro* transzkripció és transzláció rendszerben termeltettük meg, amihez ³⁵S-metionint adtunk, majd vizsgáltuk kötődési képességüket glutation-szefaróz mátrixhoz kötött Falafel-EVH1 (muslica fehérje) és R3A-EVH1 (humán fehérje) doménnel. Eredményeink megerősítették, hogy a PP4 R3 alegységek konzervált módon kötik interakciós partner fehérjéjüket, mivel mind a *Drosophila* Falafel-EVH1, mind pedig a humán R3A-EVH1 megkötötte az ecetmuslica Ctb fehérjét. Nemcsak a *Drosophila* Falafel-EVH1 hanem a humán R3 EVH1 is elvesztette kötési képességét, ha megváltoztattuk a kölcsönhatáshoz szükséges MPPP motívumot (Ctb-36-

AxPA-39), valamint megmaradt a kötés, ha egy az interakciót nem befolyásoló hasonló motívumot változtattunk meg (Ctb-51-ALHA-54) (7. ábra).



7. ábra: A Ctb fehérje kötési tesztje a humán R3A-EVH1-gyel és az ecetmuslica Falafel-EVH1-gyel. Mindkét EVH1 domén kötötte a vad típusú Ctb (bal oldal) fehérjét. Elvesztették kötési képességüket, ha megváltoztattuk a korábban azonosított esszenciális motívumot: Ctb-36-APPA-39 (középen). A kötést nem befolyásolta más FxxP/MxPP motívum mutagenézise: Ctb-51-ALHA-54 (jobb oldal). A kísérletben negatív kontrollként GST fehérjét használtunk. A fehérjetermelődés ellenőrzésére az input mintából vittünk fel a gélekre.

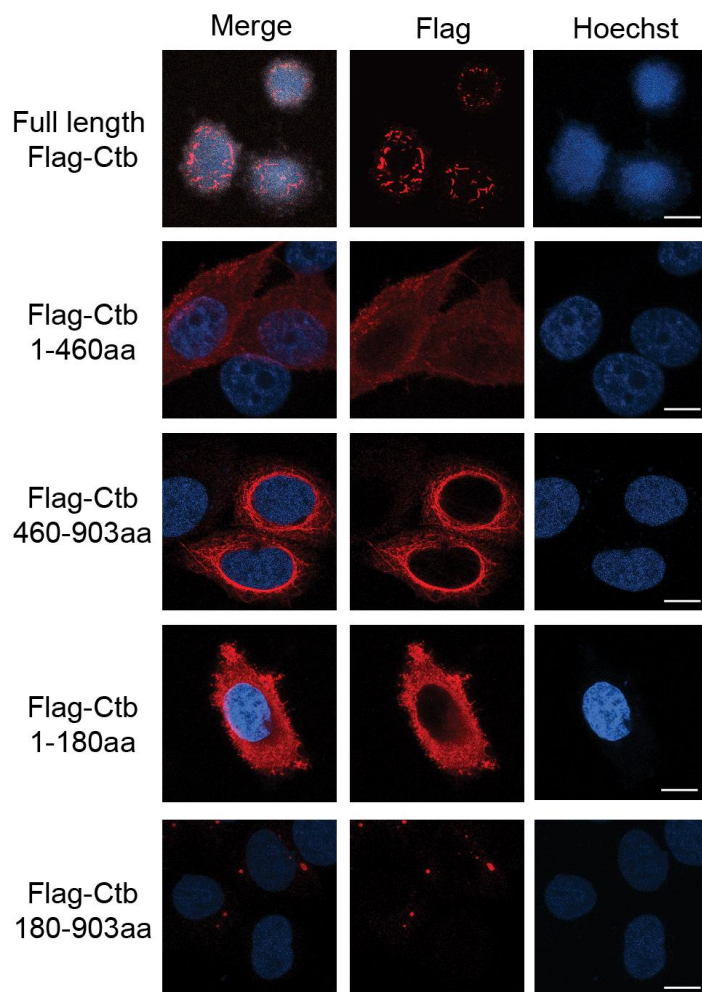
További bizonyítékokat kerestünk arra, hogy az R3 alegységek csak egy motívumot kötnek mind emberben, mind pedig ecetmuslicában. Ha a teljes hosszúságú humán R3 alegységeket (GST-R3A és GST-R3B) immobilizáltuk glutation-szefaróz mátrixhoz, azok képesek voltak megkötni a humán (Hs-Ctb) és ecetmuslica (Dm-Ctb) Ctb fehérjéket, de a kötés megszűnt, hogyha megváltoztattuk a korábban azonosított PP4-kötő konszenzus motívumokat: 771-FRVP-774 motívumot 771-ARVA-774 motívumra (humán Ctb), 36-MPPP-39 szekvenciát 36-APPA-39 szekvenciára (muslica Ctb) (8. ábra) (62,69).



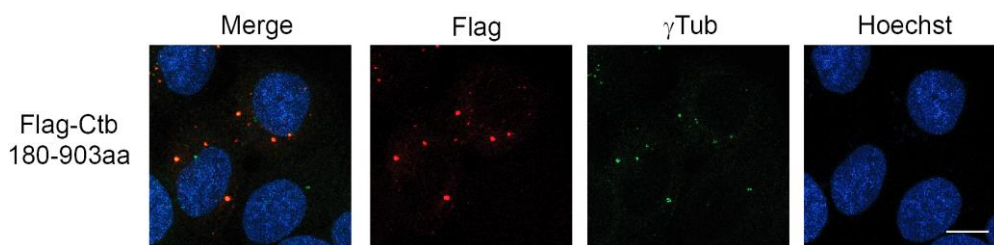
8. ábra. Az R3A és R3B köti mind a humán és mind az *ecetmuslica* Ctb-t *in vitro*. A teljes hosszúságú humán R3 alegységek (GST-R3A és R3B) kötődnek a vad típusú teljes hosszúságú humán Ctb fehérjéhez (autoradiográfia, első panel), valamint az *ecetmuslica* Ctb-hez (autoradiográfia, harmadik panel). Elvesztik a kötési képességet, ha elrontjuk az esszenciális FRVP motívumot ARVA-ra a humán Ctb (autoradiográfia, kettes panel), vagy az MPPP motívumot APPA-ra a muslica Ctb (autoradiográfia, négyes panel) esetében. A kísérletben negatív kontrollként GST fehérjét használtunk. A fehérje termelődés ellenőrzésére az input mintából vittünk fel a gélekre.

4.2. A teljes hosszúságú Flag-Ctb és a Flag-Ctb fragment fehérjék sejtben való lokalizációjának vizsgálata

Miután megvizsgáltuk, hogy a humán R3A és R3B köti a humán Ctb fehérjét *in vitro*, igazolni szeretnénk volna, hogy a Ctb *in vivo* is interakciós partnere a PP4 holoenzimnek, és hogy ez a kötés a humán Ctb esetében a 771-FRVP-774 motívumától függ. Ehhez előállítottunk egy Flag-Ctb-t kódoló plazmid konstrukciót. Ezzel humán sejteket transzfektáltunk és immunfluoreszcensen jelöltük anti-Flag ellenanyaggal. Megfigyeltük, hogy a kifejeződő Flag-Ctb fehérje lokalizáció nem megfelelő, a fehérje kristályszerű struktúrákat képzett a citoplazmában. Ezt a jelenséget korábban már más kutatók is megfigyelték (125). Ezért megpróbáltuk a teljes hosszúságú Ctb helyett, annak különféle méretű darabjait túltermelni humán sejtekben. Ueki és munkatársai két részre vágta a Ctb fehérjét egy viszonylag szimmetrikus felosztással a 460. aminosavnál (69). Ez alapján mi is erre a két részre osztottuk a Ctb fehérjét (Ctb-1-460aa és Ctb-460-903aa), valamint megvizsgáltuk a Ctb prediktált másodlagos szerkezetét is és azt találtuk, hogy 180-tól 520 aminosavig egy nagy kiterjedésű α -hélix helyezkedik el a fehérjében. A fehérje másodlagos szerkezetének predikciója a 3. Függelékben található. Azért, hogy a α -hélix intakt maradjon, létrehoztunk további két Ctb fragmentet, egy 1-től 180 aminosavig terjedő N-terminális fragmentet és egy 180-tól 903 aminosavig terjedő C-terminális részt. Ezekkel a plazmid konstrukciókkal HeLa sejteket transzfektáltunk és immunfluoreszcens jelölést végeztünk anti-Flag ellenanyaggal. A 9. ábrán jól látható, hogy a két N-terminális fragment (1-től 460-ig és 1-től 180-ig) citoplazmatikusan lokalizál, míg az Ueki által használt C-terminális darab a magmembrán köré tömörül. Az általunk vizsgált leghosszabb fragment, 180-tól 903 aminosavig bizonyult a legígéretesebbnek, amely a centroszómális fehérjékre jellemző fókuszszerű megjelenést mutatta, továbbá együtt lokalizált a centroszóma-marker γ -Tubulinnal (10 ábra). Ezt a megfigyelést alátámasztja egy másik tanulmány is, ahol leírták, hogy a Ctb fehérje C-terminálisa elegendő lehet a centroszómális lokalizációhoz (125).



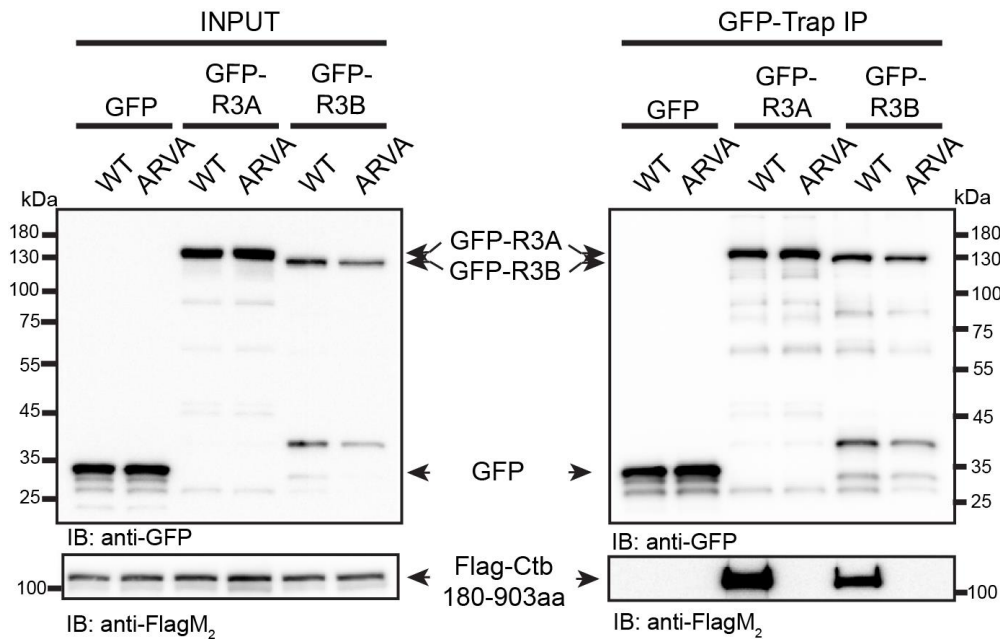
9. ábra. A Flag-jelölt Ctb-fragmentek lokalizációjának mikroszkópos vizsgálata. HeLa sejteket tranziensen transzfektáltunk különböző hosszúságú Flag-jelölt Ctb-t kódoló plazmid konstrukciókkal. 48 órával a transzfekciót követően a sejteket PFA oldattal fixáltuk és anti-Flag-gel festettük (piros). Egyedül a Flag-Ctb-180-903 aminosavas fragment mutatta a várt fókusszerű lokalizációt. A léptéksáv 10 μ m hosszúságú. A DNS-t Hoechst33342 (kék) oldattal festettük.



10. ábra. A Flag-Ctb-180-903aa fehérje centroszómális lokalizációja. HeLa sejteket tranziensen transzfektáltunk a Flag-Ctb-180-903aa fragmentet kódoló plazmid konstrukcióval. A transzfekció után a sejteket fixáltuk, majd anti-Flag (piros) és anti- γ -Tubulin (γ Tub, zöld) ellenanyaggal festettük. A két fehérje együtt lokalizál. A léptéksáv 10 μ m hosszúságú. A DNS-t Hoechst33342 oldattal festettük.

4.3. A humán PP4 R3 és Ctb kölcsönhatásának vizsgálata *in vivo* módszerrel

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a humán Ctb és a PP4R3 alegysége *in vitro* közvetlenül kötődik egymáshoz. A továbbiakban *in vivo* körülmények között is meg akartuk vizsgálni a kölcsönhatást. Ehhez a jól kifejeződő és a fenti eredményeink alapján megfelelő centroszómális lokalizációt mutató Flag-Ctb-180-903aa csonkolt fehérjét használtuk. HEK293 sejteket együtt transzfektáltunk GFP-R3A-val vagy GFP-R3B-vel, valamint vad típusú vagy 781-ARVA-784 mutáns Flag-Ctb-180-903aa fehérjét kódoló plazmid konstrukciókkal. Negatív kontrollként GFT-t használtunk. Eredményeink megerősítettek, hogy az R3A és R3B *in vivo* is képes kötni a Flag-Ctb-180-903aa-t, de elveszíti kötési képességét, ha helyspecifikus mutagenézissel megváltoztatjuk a 771-FRVP-774 PP4-felismerési motívumot 771-ARVA-774 motívumra (11. ábra).



11. ábra. Az R3A és R3B fehérje *in vivo* is köti a Flag-Ctb-180-903aa fehérjét. HEK293 sejteket ko-transzfektáltunk GFP, GFP-R3A vagy GFP-R3B és Flag-Ctb-180-903aa-WT (vad típus, az ábrán WT) vagy Flag-Ctb-180-903aa-781-ARVA-784 (az ábrán ARVA) mutáns fehérjét kódoló plazmid konstrukciókkal. Az input mintákban (bal panel) ellenőriztük a GFP-jelölt fehérjék (felső panel) és a Flag-jelölt (alsó panel) fehérjék expresszóját. A jobb oldali panellen a GFP-Trap mintákat láthatjuk. Mind a GFP-R3A, mind a GFP-R3B kötődött a gyöngyökre (jobb, felső panel) és kötötte a Flag-Ctb-180-903aa fehérjét, míg mutáns változatát egyik sem (jobb, alsó panel). A negatív kontroll GFP egyik fehérjét sem kötötte.

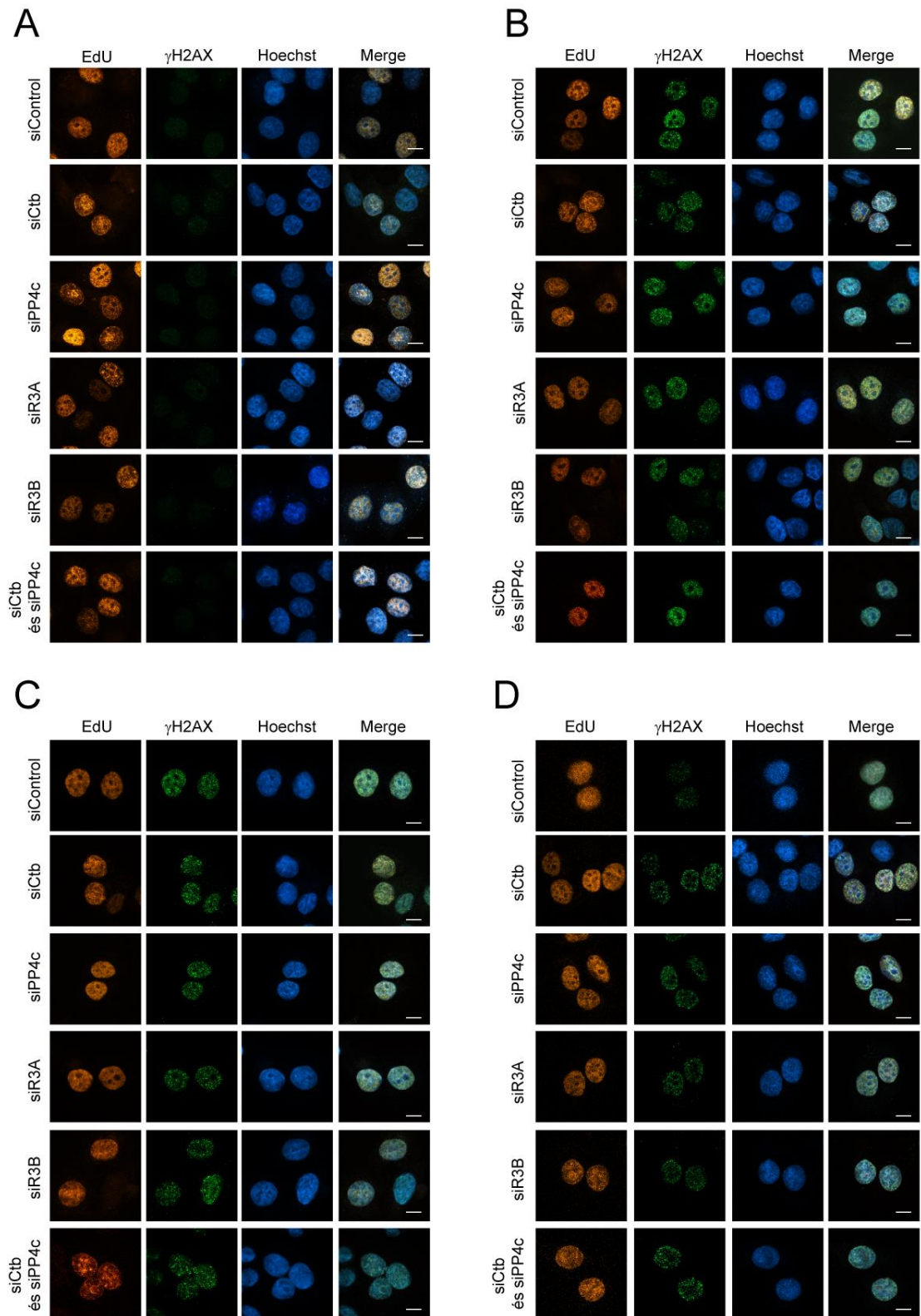
4.4. A PP4R3 és Ctb együttműködése a DNS hibajavításban

4.4.1. A PP4 alegységek és Ctb hiánya késést okoz a DNS hibajavításban

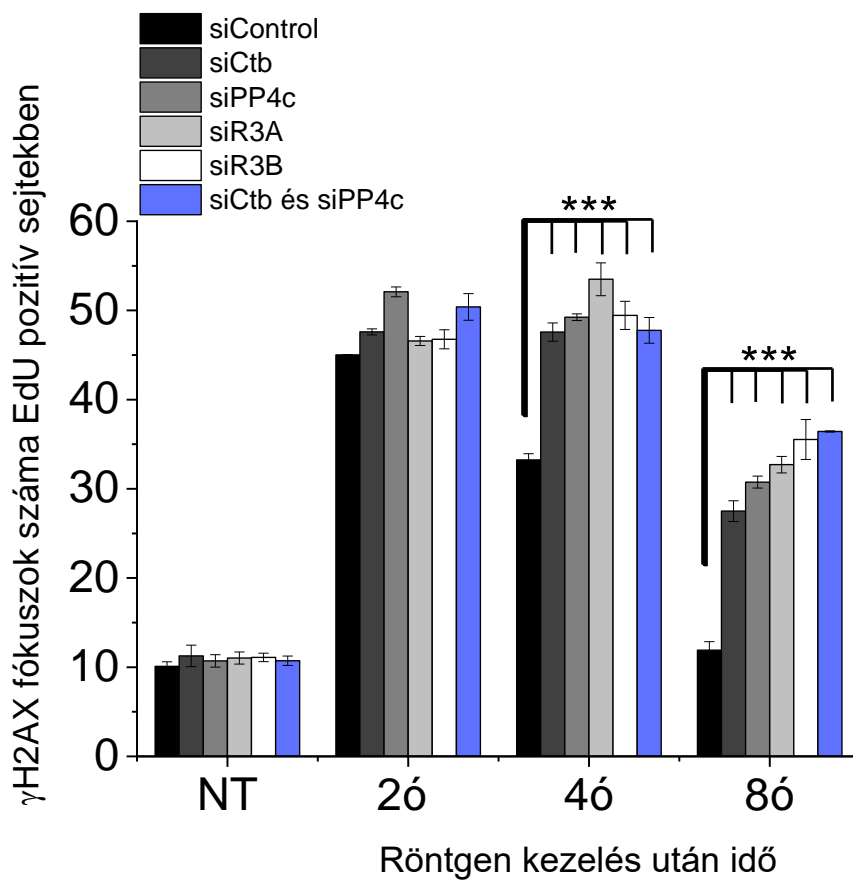
2019-ben kimutatták, hogy a Ctb-t az ATR kináz foszforilálja UV kezelt sejtekben (139). Mivel a PP4 szerepe a DNS hibajavításban jól ismert és mi magunk is sok olyan PP4-kölcsönható partnert azonosítottunk, melyeknek szerepe van a folyamatban, így felmerült bennünk a kérdés, hogy a két fehérje együttműködhet-e a DNS károsodásra adott válaszban? Ennek kiderítésére HeLa sejteket transzfektáltunk külön a *ctb*-t, *pp4c*-t, *r3a*-t, *r3b*-t és együtt a *ctb*-t és *pp4c*-t célzó kis interferáló RNS-sel (siRNS), majd 24 óra elteltével a sejteket tripszin oldattal kezeltük és két egyenlő részre osztva Petri csészében fedőlemezekben tovább növesztettük. Mivel a homológ rekombináció a sejtciklus S és G2 fázisában megy végbe, mi is az ilyen fázisban lévő sejtekben voltunk kíváncsiak arra, hogy milyen fenotípus változást okoz a fent említett fehérjék hiánya. Ezért 48 órával a transzfekciót követően a sejthez egy timidin analógot, 5-etinili-2'-dezoxiuridint (EdU) adtunk, amely képes beépülni a DNS-be az S (szintézis) fázis során. 1 óra pulzusjelölés elteltével a sejteket 2 Gray (Gy) röntgensugárzással kezeltük, majd 2, 4 és 8 óra múlva 3 % PFA oldattal fixáltuk és festettük γ H2AX ellenanyaggal (12. ábra) (148). Az EdU-t később, a gyártó által meghatározott leírást követve, egy fluoreszcens festékkel vizualizáltuk.

A γ H2AX jel a DNS károsodásra adott válasz kezdetétől egészen a hibajavítás végéig fennmaradó jel (148). A γ H2AX a H2AX hiszton egyik változata, amely a 139-es szerinnél (Ser139) ATM általi gyors foszforiláción megy keresztül, válaszul a DNS kettősszalú törésekre (DSB). Ezt a jelenséget a DNS-károsodás nyomon követésére használják, lehetővé téve a DNS hibajavító mechanizmusok vizsgálatát. A γ H2AX PP4 általi defoszforilációja után a sejtciklus a DNS hibajavítást követően újraindulhat (148).

50 EdU pozitív jelet adó sejtben megszámoltuk a γ H2AX fókusz formáló hiszton jeleit. Eredményeink alátámasztották azt a tényt, hogy az általunk vizsgált Ctb és PP4 foszfatáz alegységeknek szerepe van a DNS hibajavításban, mivel hiányuk a kontrollhoz képest késleltette a DNS hibajavítás befejezését a sejtekben, hosszabb ideig fennmaradnak a γ H2AX fókuszjelek, akár a röntgen kezelés után 8 órával is. Ez arra utal, hogy a Ctb és PP4 fehérjék depléciójakor a röntgen okozta DNS károsodás javítása lelassul (13. ábra).

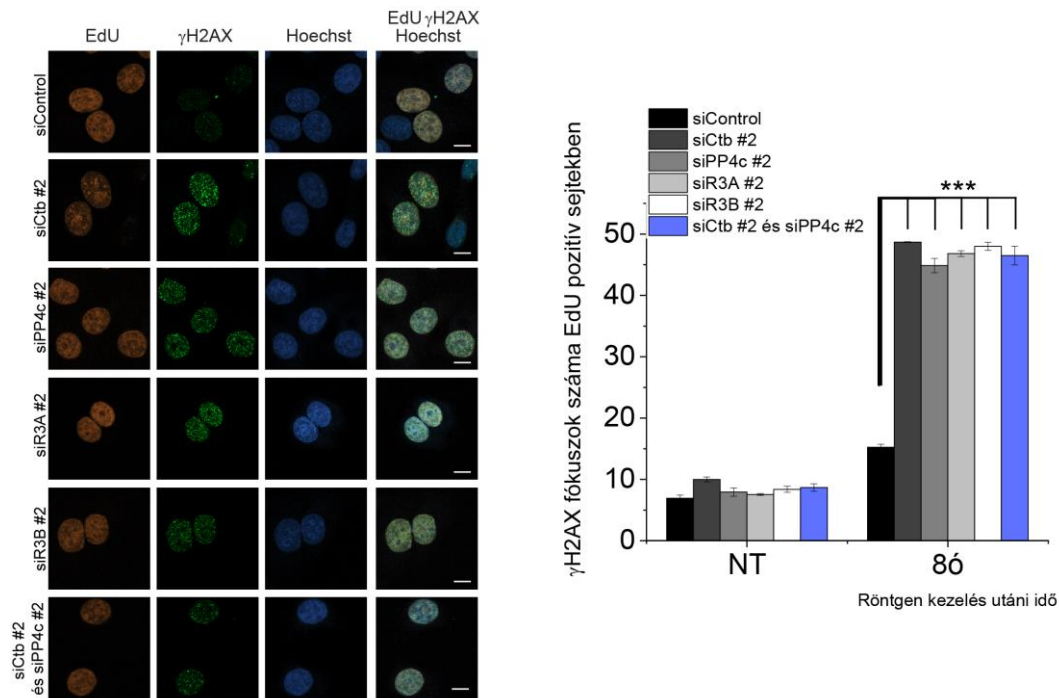


12. ábra. A Ctb és PP4 alegységek csendesítése késleltetett DNS hibajavítást eredményez. A röntgen kezelés után és 8 órával is magasan marad a γ H2AX fókuszok (zöld) száma az EdU pozitív (sárga) csendesített sejtekben. Reprezentatív képek kezeltelen (A panel) és röntgen kezelés után 2 (B panel), 4 (C panel) és 8 órával (D panel). A léptéksáv 10 μ m hosszúságú. A DNS-t Hoechst33342 oldattal festettük.



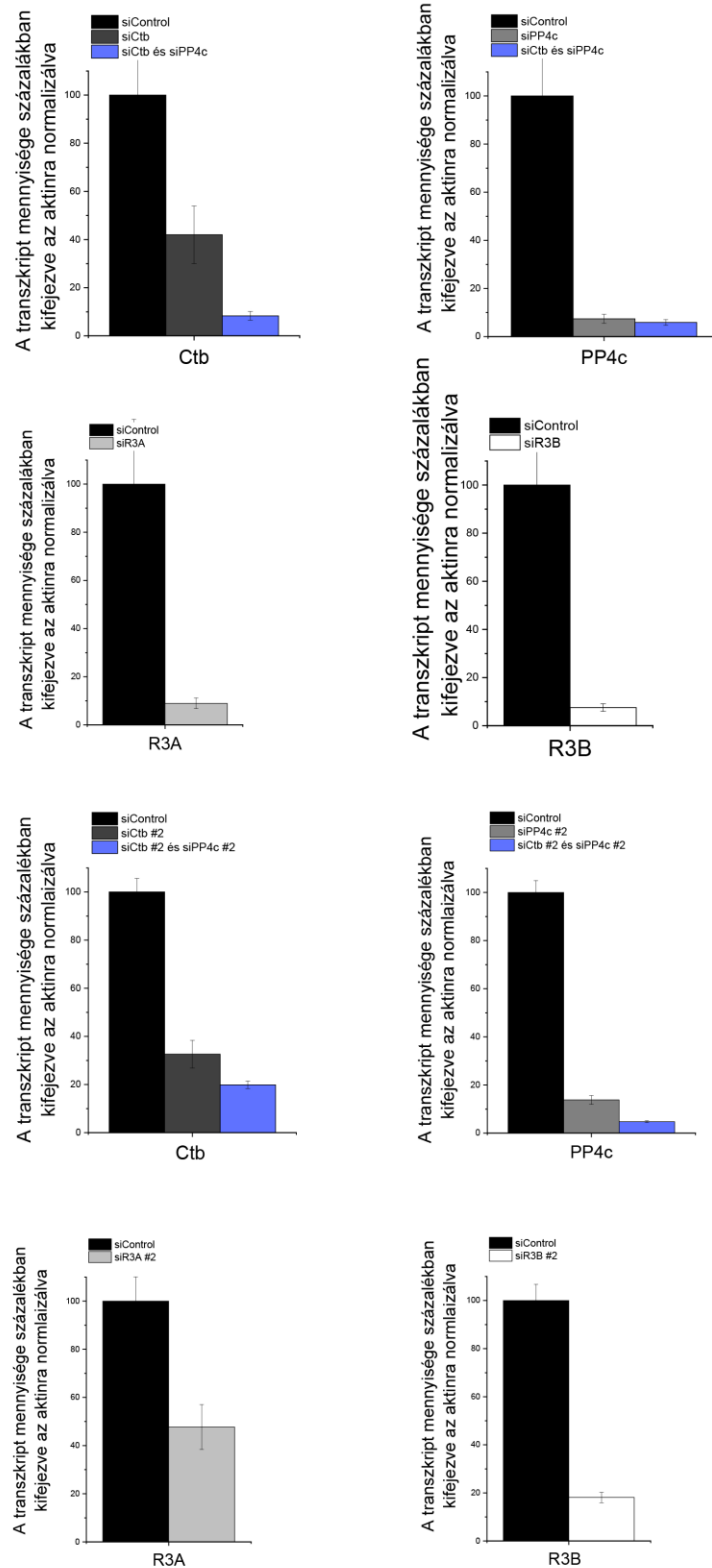
13. ábra. A Ctb és PP4 alegységek csendesítése késletetett DNS hibajavítást eredményez. Kezeletlen (NT) és a röntgensugárzással való kezelést követően 2, 4 és 8 órával EdU pozitív sejtekben. A csillag a P értéket jelöli, ami megfelel a regressziós koefficiens szignifikanciájának (*P <0.05, **P <0.01, és ***P <0.001). A kísérletet 3-szor ismételtük meg (n=3), minden alkalommal 50-50 EdU pozitív sejtben manuálisan számoltuk meg a fókuszokat.

Ezt támogatja az a tény is, hogyha a fenti kísérletet megismételtük egy más target szekvenciát célzó kis interferáló RNS készlettel, akkor hasonló eredményt kaptuk (14. ábra).

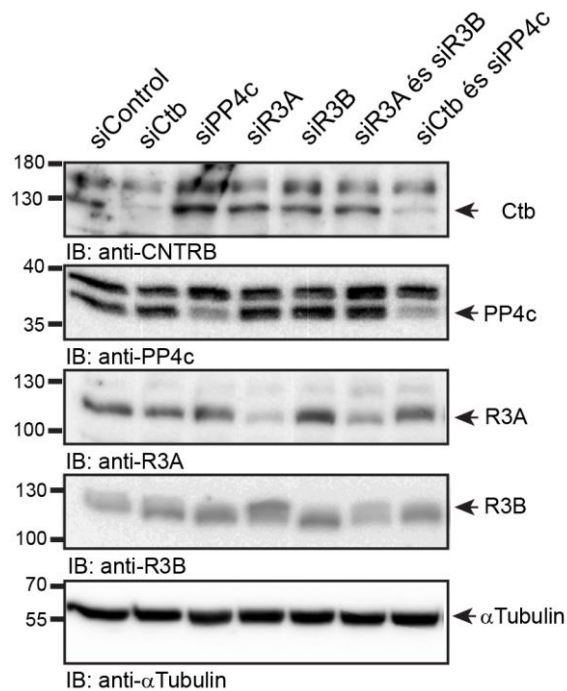


14. ábra. A Ctb és PP4 alegységek csendesítése elhúzódo γ H2AX jelet eredményez. A röntgen kezelés után 8 órával is magasan marad a γ H2AX fókuszok száma egy másik siRNS szettel csendesített sejtekben is. Reprezentatív képek (bal panel) és a statisztikai elemzés grafikonon való ábrázolása (jobb panel). Kezeletlen (NT) és a röntgen kezelést után 8 órával. A csillag a P értéket jelöli, ami megfelel a regressziós koefficiens szignifikanciájának (*P < 0.05, **P < 0.01, és ***P < 0.001). A kísérletet 3-szor ismételtük meg (n=3), minden alkalommal 50-50 EdU pozitív sejtkben manuálisan megszámoltuk a fókuszokat.

Mindkét esetben a kis interferáló RNS-ek hatékonyságát western-blot és qPCR technikával ellenőriztünk. A qPCR során a transzkript mennyiségét az aktint kódoló mRNS mennyiségéhez viszonyítottuk, ami a 15. ábrán látható. A western-blot esetében 10-10 μ g fehérjét választottunk el méret szerint SDS-PAGE segítségével, majd a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk és gén specifikus ellenanyagokkal detektáltuk (16. ábra).



15. ábra. A géncsendesítés hatékonyságának vizsgálata qPCR technikával az aktin gén kifejeződésére normalizálva. A transzfekció után 48 órával meghatároztuk a sejtek mRNS tartalmát, a csendesített *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* szintet, Minden esetben 3 technikai ismétlést végeztünk, melyek szórását az ábrán feltüntettük.

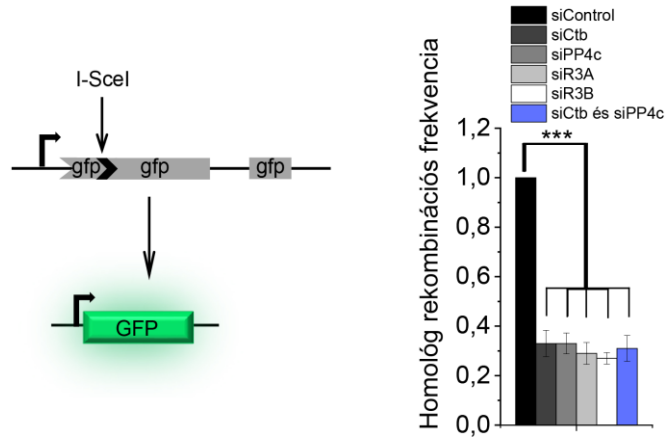


16. ábra. A géncsendesítés hatékonyságának vizsgálata western blot technikával. A transzfekció után 48 órával a sejteket 1x Leammli pufferbe forraltuk, 10-10 µg-ot SDS-PAGE-en méret szerint elválasztottuk, PVDF membránra blottoltuk, majd Ctb, PP4c, R3A, R3B specifikus ellenanyaggal vizsgáltuk.

4.4.2. A PP4 és Ctb csendesítés hatására jelentősen lecsökken a homológ rekombináció hatékonysága

A röntgensugárzás egyes és kettősszálú töréseket okoz a DNS-ben, növeli a reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyiségét, valamint DNS-fehérje keresztkötések létrejöttét indukálja, melyeket több hibajavító mechanizmus korrigál, köztük a homológ rekombinációs (HR) hibajavítás (149). A HR lejátszódásának vizsgálatára Jeremy Stark kutatócsoportja (Beckman Research Institute, USA) létrehozott egy olyan U2OS humán immortalizált stabil sejtvonalat (DR-GFP-U2OS), amelyben két módosított szekvenciájú *gfp*-t kódoló gén található. Az egyikben található egy I-SceI meganukleáz hasítóhely, amely eltolja a GFP fehérje nyitott leolvasási keretét, melynek következtében az intakt fluoreszcens fehérje nem tud termelődni. A másik *gfp* génről szintén nem képződik funkcióképes fehérje, mert a gén 5' és 3' vége hiányzik. Funkcionális, zöld fluoreszcens jelet adó GFP fehérje csak akkor tud kifejeződni, ha a sejteket transzfektáljuk az I-SceI endonukleázt kódoló plazmid konstrukcióval. Az enzim által DNS kettősszálú töréseket tudunk indukálni, specifikus helyen a riporter kazettában. A sejt felhasználja a második *gfp* gént mintaként és homológ rekombinációval létrehozza a hibátlan gént (142). Feltételezésünk szerint a PP4 és a Ctb a homológ rekombinációban játszik szerepet. Ezt alátámasztotta, hogy a *ctb*, *pp4c*, *r3a* és *r3b* külön-külön vagy a *ctb* és *pp4c* együttes

csendesítése a rekombinációs frekvencia csökkenését vonta maga után a fent említett tesztrendszerben (17. ábra).

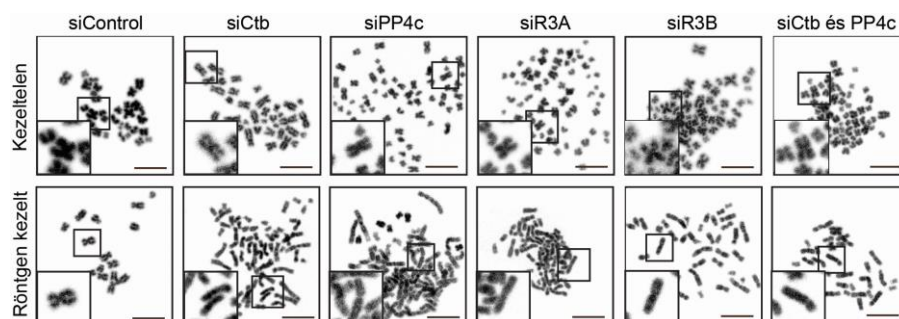


17. ábra. A PP4 alegységek és a Ctb kiütése csökkenti a homológ rekombinációs hibajavítás frekvenciáját. A DR-GFP U2OS sejtek két csonkolt *gfp* gént hordoznak, amely, csak az I-SceI hasítás és a homológ rekombináció után tud funkcióképes GFP fehérjét produkálni (sematikus ábra, bal oldal). 48 órával az endonukleáz hasítást követően a sejtpopulációban vizsgáltuk a GFP pozitív sejtek arányát. A statisztikai elemzést 3 független kísérletből (n=3) a jobb oldalon láthatjuk, minden esetben legalább 2500 sejtet számoltunk meg, A rekombinációs frekvencia minden csendesített sejtvonalon esetében csökkent. A csillag a P értéket jelöli, ami megfelel a regressziós koefficiens szignifikanciájának (*P <0.05, **P <0.01, és ***P <0.001).

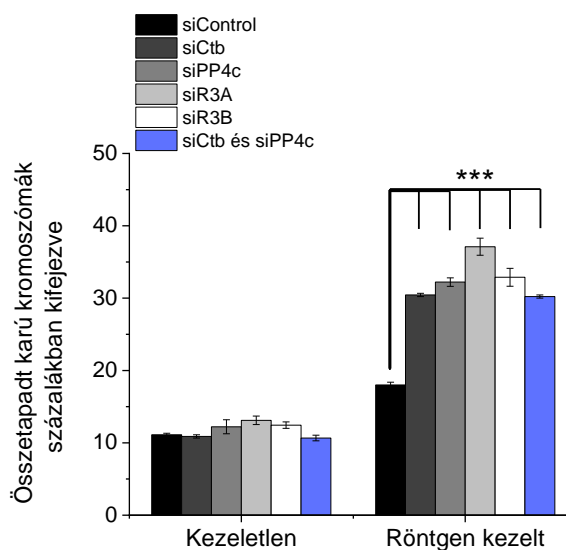
4.4.3. A PP4 alegységek és Ctb hiányában kromoszóma hibák jelentkeznek a mitózisban

Ha a DNS homológ rekombinációs hibajavítási mechanizmusa nem tud megfelelően végbemenni, akkor az kromoszóma-rendelleneségekhez, morfológiai változásokhoz vezethet. A homológ rekombinációkor a homológ kromoszómák közt átkereszteződések jönnek létre, amiket Holliday struktúráknak nevezünk, melyet a DNS szintézis után fel kell oldani, elválasztva ezzel a homológokat. Ha a Holliday junction struktúrák feloldása túl korán történik meg, például egy genetikai betegség, a Bloom szindróma esetében, akkor a rekombináció és a DNS szintézis nem tudja a DNS hibát kijavítani, ami megnöveli a genomi instabilitás és a tumorok kialakulásának kockázatát (144). Szintén e betegség kapcsán mutatták ki, hogy léteznek olyan fehérjék, amelyek az ún. Holliday keresztek összetartásáért felelnek. A *GEN1* gén deléciója során a kromatidák egymás mellett maradnak, megnyúlnak és tagolódnak (145). Annak kiderítésére, hogy a

PP4 alegységek és a Ctb a DNS hibajavítás egy későbbi szakaszában, a Holliday struktúrák feloldásában játszik-e szerepet, siRNS-sel csendesítettük külön-külön a *ctb*, a *pp4c*, a *r3a* és a *r3b*, vagy a *ctb* és *pp4c* géneket együtt. 24 óra elteltével a sejteket fele-fele arányban két Petri csészébe raktuk át, 48 óra elteltével pedig a sejtek felét 2 Gy röntgensugárzással kezeltük, a másik fele pedig kezeltelen maradt. Mindkét csoporthoz adtunk koffeint (20 µg/ml végkoncentrációban) és kolhicint (10 µg/ml végkoncentrációban), majd még 6 órán át növesztettük 37 °C-on 5 % CO₂ mellett. A koffein ebben a koncentrációban elősegíti, hogy a sejtek a DNS károsodás ellenére se álljanak meg az S fázisban, hanem átjussanak a G2/M ellenőrző-ponton (150). A kolhicin megakadályozza a mikrotubulusok polimerizációját, ezáltal a sejteket M fázisban tartja. A kezelés hatására feldúsulnak a mitotikus sejtek, amelyekből metafázisos kromoszómák preparálhatók (151). A fent leírt kísérletből készült kromoszóma csoportokból 150-150-et számoltunk meg, jellemeztünk és osztályoztunk morfológiai jegyeik alapján. Elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a testvérkromatidák össze vannak-e tapadva (rossz morfológia, amit arms-closed fenotípusnak nevezünk el), vagy szétváltak és a metafázisra jellemző X vagy V alakú kromoszómákat hoztak létre. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a röntgensugárzással kezelt és a *ctb*, a *pp4c*, a *r3a* és a *r3b* külön-külön, vagy a *ctb* és *pp4c* együtt csendesített sejtekben jelentősen megnőtt az összetapadt kromatidájú kromoszómák (arms-closed) aránya, ami arra utal, hogy a Holliday struktúrák ezen fehérjék hiányában nem tudnak feloldódni (18. és 19. ábra). Ezzel ellentétesen a kezeltelen sejtekben, vagy a kontroll csendesített sejtekben nem láttunk jelentős növekedést az arms-closed morfológiában. Eredményeink alapján elmondható, hogy a PP4 alegységek és a Ctb csendesítésének következtében röntgenkezelés után sérülhet a DNS hibajavítás.



18. ábra. A Ctb és a PP4 alegységek csendesítése kromoszóma hibákat eredményez röntgenkezelés hatására. Reprezentatív képek a kezeltelen, normál X vagy V alakot mutató kromoszómákról (felső sor) és a röntgenkezelés és géncsökkentés hatására megjelenő összetapadt-karú (arms-closed) kromoszómákról (alsó sor). A léptéksáv 10 µm hosszúságú.

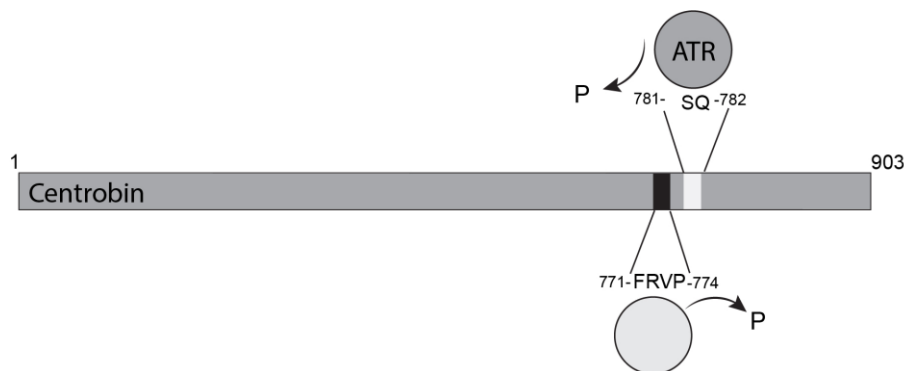


19. ábra. A PP4 alegységek és Ctb csendesítése minden esetben megnövekedett összetapadt karú kromoszóma csoportot eredményezett. A statisztikai elemzést 3 független kísérletből (n=3) végeztük, minden esetben 150-150 kromoszóma csoportot osztályoztunk. Az összetapadt kromatidájú kromoszómák százalékos aránya minden esetben szignifikánsan nőtt. A csillag a P értéket jelöli, ami megfelel a regressziós koefficiens szignifikanciájának (*P <0.05, **P <0.01, és *P <0.001).**

4.5. A Ctb ATR kináz általi foszforilációs helyének vizsgálata

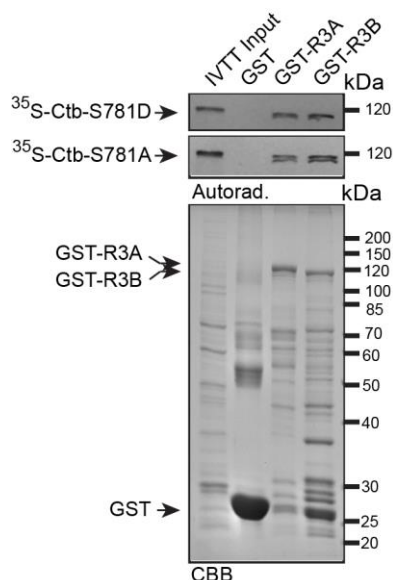
4.5.1. *In vitro* kötési kísérlet a Ctb ATR foszforilációs helyének mutáns változatai és a PP4 R3A és R3B alegységek közt

Korábban kimutatták, hogy a Ctb-t UV sugárzás hatására az ATR kináz foszforilálja (139). Egy másik tanulmányban, ahol ATM és ATR felismerő konszenzus SQ-motívumokat vizsgáltak nagyléptékű módszerekkel, azonosítottak egy foszforilációs helyet a humán Ctb fehérjében, Ser781 (p-Ser781), ami röntgenkezelés hatására jelent meg (93). Megfigyeltük, hogy ez az SQ motívum (és a benne található Ser781) csupán 10 aminosavra található a 771-774-es pozícióban lévő PP4-kötő FRVP motívumtól. Ezért azt feltételeztük, hogy a p-Ser781 lehet a PP4 által defoszforilált aminosav is (20. ábra). Ennek vizsgálatára, helyspecifikus mutagenézissel a Ser781-et alaninra cseréltük (S781A), amely a defoszforilált fehérjét mimikálja, illetve aszparaginsavra cseréltük (S781D), ami egy foszformimikrit jelent, vagyis a sejt úgy érzékeli, hogy a fehérje állandóan foszforilált. Tekintve, hogy a p-Ser781 szükséges a Ctb funkciójához, mindkét pontmutációt hordozó Ctb esetében változást vártunk a DNS károsodási válaszban.



20. ábra. A Ctb fehérje sematikus képe. A fehérje C-terminálisán található az R3 kötési motívum (771-FRVP-774), tőle pedig tíz aminosavra egy lehetséges ATR foszforilációs hely (S781).

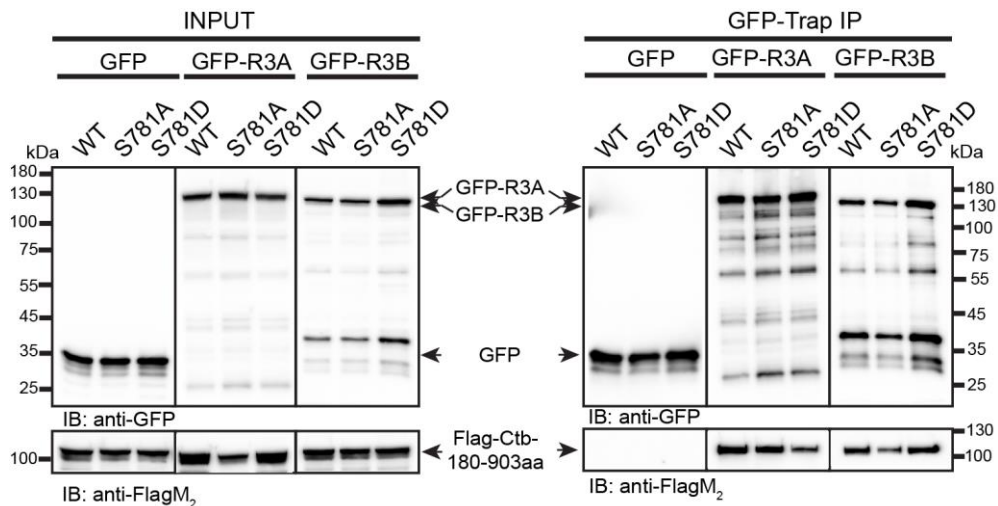
Először azt vizsgáltuk, hogy az aminosavcserek befolyásolják-e a Ctb és a R3A, illetve a Ctb és a R3B közötti fizikai kölcsönhatást *in vitro*. Ehhez, a már korábban is alkalmazott GST-IVTT módszert használtuk (140). *In vitro* transzkripció és transzláció rendszerben előállítottuk a radioaktívan jelölt ^{35}S -Ctb-S781A, illetve ^{35}S -Ctb-S781D mutáns fehérjét, majd kötési kísérletet végeztünk a glutation-szefaróz mátrixhoz immobilizált GST-R3A, illetve GST-R3B csali rekombináns fehérjékkel. Kimutattuk, hogy mindkét R3 izoforma közvetlen kölcsönhatásba lép a Ctb SQ mutánsaival. A fenti kísérlet alapján elmondhatjuk, hogy a Ser781 mutációja nem befolyásolja a kölcsönhatást a Ctb és az R3 alegységek között (21. ábra).



21. ábra *In vitro* kötési kísérlet a Ctb mutánsok és a R3 alegység között. A teljes hosszúságú humán R3 alegységek (R3A és R3B) kötik mind a S781D mutáns Ctb-t (felső panel), mind pedig az S781A mutáns Ctb-t (középső panel). A kísérletben negatív kontrollként GST fehérjét használtunk. A fehérje termelődés ellenőrzésére az input mintából vittünk fel a gélekre.

4.5.2. *In vivo* kötési kísérlet a Ctb Ser781 pontmutánsai és a PP4R3A/B alegységek között

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a kötés *in vivo* is létrejön, ko-immunoprecipitációs (co-IP) kísérletet végeztünk humán sejtekből. Ehhez HEK293 sejteket transzfektáltunk GFP-vel vagy GFP-R3A-val vagy GFP-R3B-vel, valamint Flag-Ctb-180-903aa-S781A vagy Flag-Ctb-180-903aa-S781D fehérjékkel. Pozitív kontrollként a Flag-Ctb-180-903aa-WT vad-típusú fehérjét használtuk. A GFP-Trap coIP-t kísérletben kimutattuk, hogy az R3A, illetve az R3B és a Ctb közötti kölcsönhatást nem befolyásolja az ATR kináz foszforilációs helyének mutációja sem *in vitro* (21. ábra), sem pedig *in vivo* (22. ábra). Ezzel ellentétben a PP4-kötő FRVP hely elrontása mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* megszüntette a kölcsönhatást (9. és 11. ábra).

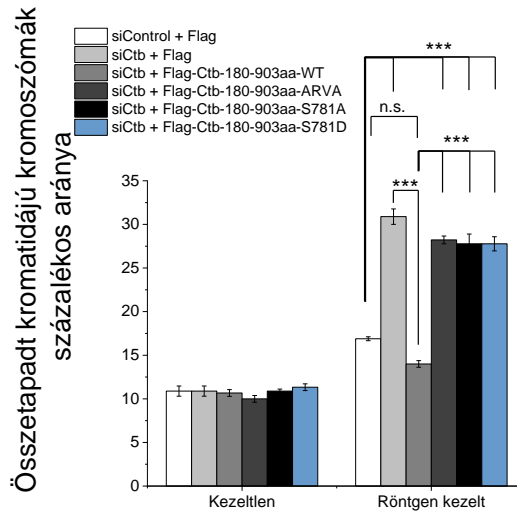


22. ábra. A R3A és R3B fehérje kötési tesztje a Flag-Ctb-180-903aa variánsokkal. Az R3A és R3B *in vivo* is köti a Flag-Ctb-180-903aa-S781A, illetve a Flag-Ctb-180-903aa-S781D fehérjét. HEK293 sejteket ko-transzfektáltunk GFP-vel, GFP-R3A-val vagy GFP-R3B-vel és Flag-Ctb-180-903aa-WT (vad típus) vagy Flag-Ctb-180-903aa-S781A vagy Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutáns fehérjét kódoló plazmid konstrukciókkal. Az input mintákban (bal panel) ellenőriztük a GFP-jelölt fehérjék (felső panel) és a Flag-jelölt (alsó panel) fehérjék termelődését. A jobb oldali panelen a GFP-Trap minták láthatók. Mind a GFP-R3A, mind a GFP-R3B kötődött a gyöngyökre (felső panel) és kötötte a Flag-Ctb-180-903aa fehérjét vagy annak mutáns változatát (alsó panel). A negatív kontroll GFP egyik fehérjét sem kötötte meg.

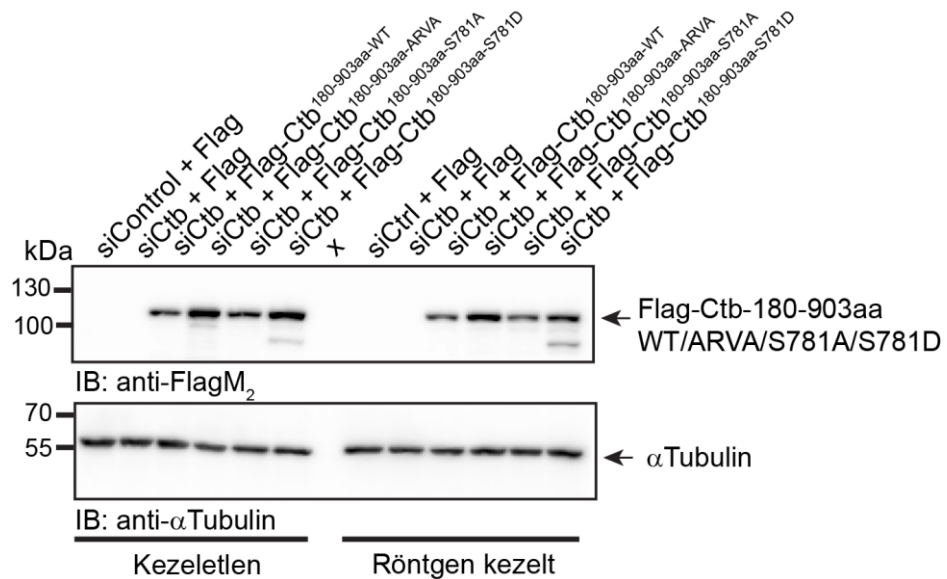
4.5.3. A Ctb csendesítés és röntgenkezelés hatására kialakuló hibás kromoszóma morfológia menekítése

Felmerült a kérdés, hogy a Ctb csendesítés és röntgenkezelés okozta megnövekedett hibás kromoszóma fenotípust képes-e menekíteni a transzgenikus Ctb vagy annak ARVA (FRVP mutáns), illetve S781A és S781D variánsai. Ennek vizsgálatára humán sejteket együtt transzfektáltuk az endogén *ctb* 5' végét célzó siRNS-sel, valamint Flag-címkézett Flag-Ctb180-903aa-WT, Flag-Ctb-180-903aa-S781A, Flag-Ctb-180-903aa-S7891D, vagy Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-774 mutáns fehérjét kódoló plazmidokkal, 24 órával a transzfekció után a sejteket fele-fele arányban ketté osztottuk, majd újabb 24 óra elteltével a felét kezeltük 2 Gy erősségű röntgensugárzással, majd kaffeinnel és kolhicinnel kezelve további hat órán át növesztettük őket 37 °C-on 5 % CO₂ mellett. Ezt követően mitotikus kromoszómákat preparáltunk és mintánkként 150-150 kromoszóma csoportot számoltunk meg, jellemeztünk és osztályoztunk a karjaik összetapadási morfológiája alapján. A csendesítés igazoló qPCR eredmények a 26. ábrán láthatók.

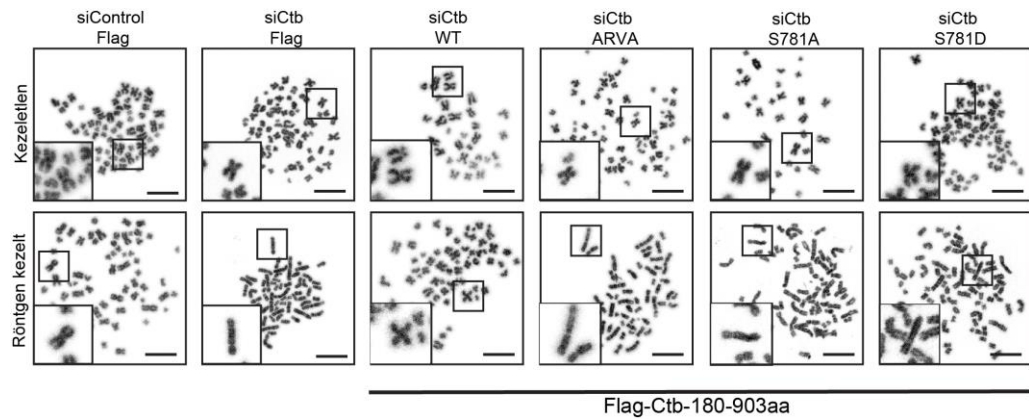
Ahogy azt korábban megfigyeltük a Ctb fehérje szintjének csökkenésére és röntgenkezelés hatására megnőtt az összetapadt testvérkromatidájú, arms-closed morfológiát mutató kromoszómák aránya a mitotikus sejtekben (23. ábra, világos szürke). Fontos megfigyelés, hogy ezt az arányt a normális szintre tolta vissza a vad-típusú Flag-Ctb-180-903aa kifejeződése (23. ábra szürke), vagyis a transzgenikus Flag-Ctb-180-903aa fragment képes menekíteni az endogén Ctb fehérje hiányából eredő fenotípus változást. Ezzel ellentétben, habár ugyanolyan mennyiségben fejeződtek ki, mint a vad-típusú konstrukció (24. ábra), a Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-774, a Flag-Ctb-180-903aa-S781A, vagy pedig a Flag-Ctb-180-903aa-S781D Ctb variánsok egyike sem tudta komplementálni az endogén Ctb homológ rekombinációban betöltött szerepét (23. ábra). A fenotípus változást bemutató reprezentatív képeket a 25. ábrán mutatjuk be. Következésképpen elmondhatjuk, hogy az PP4 Ctb-hoz történő fizikai kapcsolódásának, azaz az FRVP motívum integritásának, valamint az ATR kináz által foszforilált SQ motívumnak nélkülözhetetlen szerepe van a Ctb HR-ben betöltött szerepének szabályozásában.



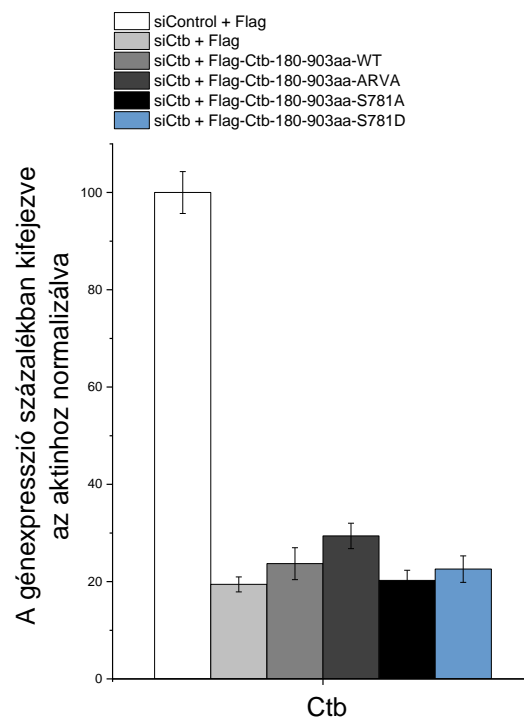
23. ábra. A Ctb csendesítés okozta fenotípus változás menekítése. A Ctb csendesítés megnövekedett összetapadt kromatidájú kromoszóma csoportot eredményezett, amit csak a vad típusú Ctb fragment tudott menekíteni (Flag-Ctb-180-903aa-WT), a Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-781, a Flag-Ctb-180-903aa-S781A és a Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutáns nem, ez esetben mindenhol szignifikáns különbséget találtunk a negatív kontroll (siCtrl) és az siCtb és Flag-Ctb-WT között. A statisztikai elemzést 3 független kísérletből (n=3) végeztük, minden esetben 150-150 kromoszóma csoportot osztályoztunk. A csillag a P értéket jelöli, ami megfelel a regressziós koefficiens szignifikanciájának (*P < 0.05, **P < 0.01, és ***P < 0.001).



24. ábra. A Flag-Ctb fragment variánsok kifejeződésének ellenőrzése western blot technikával. A bevitt Flag-Ctb-180-903aa-WT, Flag-Ctb180-903aa-781-ARVA-774 (az ábrán Flag-Ctb-180-903aa-ARVA), Flag-Ctb-180-903aa-S781A, illetve Flag-Ctb-180-903aa-S781D fehérjék minden esetben termelődtek (felső panel). Az azonos fehérje mennyiségeket a gélen α -Tubulin-nal igazoltuk. Negatív kontrollnak siCtrl-t használtunk ko-transzfektálva a pFlagCMV4 üres plazmiddal, pozitív kontrollként a siCtb és a pFlagCMV4-et használtunk.



25. ábra. A Flag-Ctb-180-903aa fragment variánsok menekítési kísérlete. A Ctb csendesítése röntgenkezelésen átesett sejtekben kromoszóma morfológiai aberrációkat eredményez, melyet csak a Flag-Ctb-180-903aa-WT fehérje termelődése tudott menekíteni. Reprezentatív képek a kezeletlen, normál X vagy V alakot mutató kromoszómákról (felső sor) és a röntgen kezelés hatására megjelenő összetapadt karú kromoszómákról (alsó sor, Flag-Ctb-180-903aa-771-ARVA-774, Flag-Ctb-180-903aa-S781A és Flag-Ctb-180-903aa-S781D esetében), kivétel a Flag-Ctb-180-903aa-WT. A léptéksáv 10 μm hosszúságú.



26. ábra. Az endogén Ctb csendesítésének igazolása transzgenikus Ctb túltermelő háttérrel qPCR technológiával az aktin kifejeződésére normalizálva. A transzfekció után 48 órával meghatároztuk a sejtek mRNS tartalmát a csendesített *ctb*-re nézve. Minden esetben 3 technikai ismétlést végeztünk, melyek szórását az ábrán feltüntettük.

5. Megbeszélés

A sejtek genetikai anyaga minden nap ki van téve olyan exogén és endogén károsító hatással bíró tényezőknek, amelyek különböző DNS hibákat okoznak. Ezen hibákra reagál a DNS károsodási válasz (DDR). A DDR detektálja a károsodást, szignalizálja, leállítja a sejtciklust, kijavítja a károsodást, majd, ha ez megtörtént, a sejtciklust újraindítja. A folyamat összes pontjának szabályozásában elengedhetetlen a fehérje kinázok és a fehérje foszfatázok együttműködése. A foszfatázok nélkülözhetetlenek a genom integritásának megőrzésében, azáltal, hogy a DNS hibajavítás folyamatában a kinázok aktivitását ellensúlyozzák, valamint a hiba kijavítása után szabályozzák a sejt visszatérését a normál sejtciklusba. Ismert, hogy a rákos sejtek kontrollálatlan növekedésre tesznek szert, mert ezekben a sejtekben nem működnek megfelelően az ellenőrzőpontok. Nem meglepő, hogy a legtöbb onkogén a növekedés és osztódás fő szabályozói, a fehérje kinázok és foszfatázok, valamint ismertek ezen kívül a foszfatázok tumorszupresszor funkciói is. Ezen tényezők együttesen hangsúlyozzák, hogy a kinázok és a foszfatázok vizsgálata és működésének megértése fontos cél a rákos megbetegedések elleni harcban, lehetővé téve a célzott, személyre szabott terápiát (152,153).

Emiatt kutatók olyan természetes szereket próbálnak azonosítani, amelyek a foszfatázok működését célzottan gátolják vagy stimulálják. Például, a rovarokból izolált kantaridin vegyület gátolja a PP1, PP2A és PP4 foszfatázok katalitikus alegységeit. A kantaridin hatékonyságát ígéretesnek találták tüdő- és hólyagrák kezelésére állatmodelleken végzett kísérletekben (154). Fontos azonban megjegyezni, hogy a fenti és más vizsgált szereknek a klinikai alkalmazása egyelőre korlátozott, mert a katalitikus alegységek több különböző holoenzimet tudnak létrehozni, melyek közt kicsi a gátlószerek szelektivitása. Ahhoz, hogy ezeket a klinikumban terápiás szerként használhassuk fontos, hogy megértsük a foszfatázok szubsztrátum-kötő mechanizmusainak molekuláris részleteit és tisztázzuk a szubsztrátum defoszforilációjának mechanikai alapjait. Csak ezen részletek megértése teszi lehetővé, hogy létrehozzunk, olyan vegyületeket, amelyek hatékonyan és szelektíven befolyásolják a foszfatázok működését a sejtben.

Az evolúciósan konzervált PP4 foszfatáz számos folyamat szabályozásában vesz részt a sejtben, többek közt a sejtciklus szabályozásában, a T sejttes immunválaszban, az

apoptózisban és a glükóz metabolizmusában (32). A DNS hibajavításban betöltött szerepe régóta ismert, de ennek molekuláris részleteit tovább kell vizsgálni, ugyanis a PP4 fehérje a többi foszfatázhoz hasonlóan viselkedhet onkogénként és tumorszupresszorként is, valamint a katalitikus alegység ez esetben is több különböző holoenzimet képes létrehozni a regulátor alegységekkel (155–157). Kimutatták például, hogy míg mellrák, tüdőrák és vastagbélrák tumorokban túlzottan expresszálódik, addig petefészekrák esetén alacsonyan fejeződik ki (155–157). A PP4c-R2-R3 a leggyakoribb heterotrimer holoenzim a sejtben, melyben az R2 váz alegység, az R3 regulátor alegység szerepet tölt be. Korábbi munkánk során kimutattuk, hogy az R3 alegység két N-terminális doménje (EVH1 és Smk1) ismeri fel és köti meg az interakciós partnerfehérjéket (célfehérjéket és szubsztrátumokat). Míg az EVH1 esetében korábbi tanulmányunkban feltártuk, hogy ez a domén a kanonikus EVH1 doménnel ellentétben kevésbé prolin gazdag szekvenciákat, FxxP, illetve MxPP konszenzus motívumokat ismer fel és köt meg, valamint a kötésben a kanonikus EVH1 doménekre jellemző izoleucin, valin aminosavak mellett egy leucin aminosav, ami konzervált minden R3 alegységben, vesz részt a kötésben a fenilalanin helyett (62,66,67). Az Smk1 esetében még nem ismert kötési szekvencia, de igazoltuk, hogy FxxP, illetve MxPP motívum független módon egy teljesen más szubsztrátum garnitúrát köt a holoenzimhez, mint az EVH1 domén. A felismerő szekvencia ismerete azért fontos, mert így olyan kis peptid-, illetve nem peptid-analóg molekulákat lehet tervezni és szintetizálni, amelyek interferálnak az EVH1 és interakciós partnere közti kötéssel.

Munkánk során elsőként megvizsgáltuk a kötést egy újonnan azonosított interakciós partner fehérje, a Centrobin (Ctb) és az R3-EVH1 között. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy míg humánban egy C-terminálison elhelyezkedő, a 771-től 774-ig tartó FRVP (771-FRVP-774) motívum, addig ecetmuslicában az N-terminálison található Ctb-36-MPPP-39 motívum kritikus az R3 alegységhez való kötéshez *in vitro*. Érdekes, hogy míg a Ctb-R3 interakció létrejön, addig ugyanazon kötési motívum nincs jelen mindkét fajban. Ezért munkánk során megvizsgáltuk és kimutattuk, hogy ha a kötési motívum nem is, de a kötés mechanizmusa konzerválódott az evolúció során. Képes mind az ecetmuslica, mind a humán R3 kötni az ecetmuslica, illetve humán Ctb fehérjéket. A kötés megszűnik a humán R3 alegységek és a humán, illetve *Drosophila melanogaster* Ctb fehérjével, ha megváltoztatjuk a kötéshez szükséges MxPP, illetve FxxP motívumokat.

Ezt követően a kötést megvizsgáltuk *in vivo* körülmények között. A teljes hosszúságú Ctb fehérje a sejtben nem volt szolúbilis, kristályszerű struktúrákat képezett, ahogy azt már korábban mások is leírták (158). Ezért az *in vivo* kísérletekhez több különböző méretű Ctb fragmentet hoztunk létre és vizsgáltunk meg, melyek közt a Ctb-180-903aa fragment szolúbilis volt és centroszómális lokalizációt mutatott. Az *in vivo* kötési kísérletben a Ctb-180-903aa fragment képes volt kötődni a R3A, illetve az R3B alegységgel, az interakció megszűnt, ha megváltoztattuk az FRVP motívumot ARVA motívumra. Következésképpen elmondható, hogy a Ctb és az R3 alegységek közti interakció egyetlen FRVP motívumtól függ mind *in vivo* mind *in vitro* körülmények között. Ez azért is fontos, mert a humán Ctb-FRVP motívum prolin aminosavának szerinre való mutációját, vagyis R3-hoz nem kötő variánsát, leírták rosszindulatú melanoma daganatos betegek mintáiban, így elképzelhető, hogy ez az interakció fontos a betegségek megelőzésében (159). Ezt alátámoogatja az a tény, hogy a Ctb fehérjéről leírták, hogy részt vesz a DNS hibajavításban (139). A PP4 szerepe ezen folyamatban már ismert, de molekuláris részletei még nem teljesen tisztázottak (28). Ezért megvizsgáltuk a két fehérje szerepét a DNS hibajavítás során. Kimutattuk, hogy a PP4 foszfatáz katalitikus és két regulátor alegysége (R3A és R3B), valamint Ctb fehérje hiányában a DNS hibajelként számító γ H2AX fókuszok száma magasan marad a kontroll mintához képest 8 órával a röntgensugárzással történő kezelést követően, ami egy késést eredményez a DDR-ben.

A PP4-ről ismert, hogy több homológ rekombinációs repairben (HR) részt vevő fehérjét defoszforilál, mint például a γ H2AX-et, az RPA komplexet és a RAD53-at (28). Ezért a PP4c, R3A, R3B és Ctb fehérjék szerepét megvizsgáltuk a DR-GFP rendszert használva a HR-ban. A fehérjék hiányában a homológ rekombináció repair frekvenciája csökken, a I-SceI endonukleáz által létrehozott DNS kettősszálú törést nem tudják hatékonyan javítani ezek a sejtek.

Ha a DNS hibajavítás nem megfelelően megy végbe az kromoszóma rendelleneségekkel járhat. Kimutattuk, hogy a PP4 alegységek és a Ctb csendesítés röntgensugárzással való kezelés után a G2/M ellenőrző pont kikapcsolásakor rendellenes morfológiájú kromoszómák keletkeznek, a két testvérkromatida összekapcsolódik, amit az úgynevezett Holliday junction struktúra rögzített szerkezete eredményezhet. Ez összefüggésbe hozható azzal, hogy a foszfatázok hiánya betegségekhez vezethet, hiszen már más fehérjék esetében is kimutatták, hogy ezek a struktúrák, ha nem kerülnek időben

feloldásra, akkor a sejtosztódás folyamán ezek a kromoszómák elveszhetnek, eltörhetnek, vagy esetleg egy-egy leány sejtbe több DNS kerülhet és aneuploiddá válhatnak a sejtek (144,145).

Kísérleteinkben azért vontuk be a 781-es pozícióban lévő szerin (S781) vizsgálatát, mert egy korábbi foszfoproteomikai elemzés során azt találták, hogy röntgenkezelés hatására képes foszforilálódni (93). Foszfátázok esetében korábban már leírták, hogy a defoszforilálódó aminosav közel helyezkedik el a felismerő motívumhoz (160). A PP4 R3-hoz kötő FRVP (771-FRVP-778) motívum és a 781-es szerin aminosav közt csupán tíz aminosav található. Kísérleteinkben a szerint alaninra (S781A), vagy pedig aszparaginsavra (S781D) változtattuk. Ez nem volt hatással az R3A vagy R3B, illetve a Ctb fehérje közti kölcsönhatásra sem *in vivo*, sem pedig *in vitro* körülmények közt. A S781A, S781D, illetve 771-ARVA-774 mutációk a Ctb fehérjében nem tette lehetővé a megfelelő DNS hibajavítást. A fent leírt kromoszóma fenotípus, megfigyelhető volt, hogyha az endogén Ctb fehérjét depletáltuk és a mutáns Ctb-180-903aa-S781A, Ctb-180-903-S781D, Ctb-180-903aa-771-ARVA-774 fragmenteket transzfektáltuk a sejtekbe. A vad típusú Ctb (Ctb-180-903aa-WT) fehérje menekíteni tudta az aberráns kromoszóma fenotípus megjelenését. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az S781 aminosav, valamint a FRVP-motívum integritásának megléte, létfontosságú a Ctb megfelelő DNS hibajavító funkciójához.

Korábban egy élesztő kettős-hibrid kísérletben kimutatták, hogy a Ctb kötődik a BRCA2 DNS hibajavításban résztvevő fehérjéhez (125). Innen ered a neve is, Centrosomal BRCA2-interacting protein. Munkánk során fény derült arra, hogy a Ctb szükséges a megfelelő homológ rekombinációs repair működéséhez, hiányában késik a DNS hibajavítás és aberráns kromoszómák jelennek meg. Annak megértése, hogy a Ctb és a BRCA2 fehérje közti interakció a fehérjék DNS hibajavításban betöltött szerepéhez vagy centroszómális funkciójához szükséges-e, valamint, hogy ehhez indokolt-e a Ctb PP4 általi defoszforilációja még nyitott kérdés maradt, és további kutatások tárgyát képezi.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek, **Dr. Lipinszki Zoltánnak**, hogy az SZBK MTA Lendület Sejtciklus Szabályozás Kutatócsoportjában elsajátíthattam a kutatómunkához szükséges szakmai tudást. Köszönöm Zoltánnak a tanácsait, amelyek által minden nap fejlődhettem, valamint az évek során nyújtott segítségét és támogatását.

Köszönettel tartozom **Dr. Udvardy Andornak**, aki folyamatos fejlődésre ösztönzött és köszönöm **Udvardy Katalinnak**, hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Hálásan köszönöm **Dr. Juhász Szilviának** és **Dr. Ábrahám Editnek** a folyamatos biztatást, megszámlálhatatlan szakmai tanácsot és a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségüket.

Külön köszönet a qPCR kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért **Dr. Sinka Ritának** (SZTE TTIK, Genetikai Tanszék).

Hálásan köszönöm **Ökrösné Katalinnak** a molekuláris laborban nyújtott segítségét.

Köszönöm laboratóriumunk korábbi munkatársainak **Dr. Kármán Zoltánnak**, **Dr. Fábri-Ördögh Lillának** és **Dán Kingának**, hogy hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokkal láttak el.

Köszönettel tartozom **Mònica Torras-nak** és **Fernando Azorín-nak** (IRB, Barcelona), hogy a kutatócsoportjukban töltött 2 hét alatt megtanítottak a mitótikus kromoszómák preparálására és analízisére.

Végtelen hálával tartozom családomnak **Nagy Lászlónak**, **Nagy Zsuzsánnának**, ifj. **Nagy Lászlónak** és férjemnek **Réthy Szabolcsnak** támogatásukért.

Doktori tanulmányaimat az SZTE Biológia Doktori Iskola (PhD Ösztöndíj), a Márton Áron Szakkollégium, a Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj program (NTP-NFTÖ-21-B-0221, NTP-NFTÖ-22-B-0041, NTP-NFTÖ-19-B-0063) és a Campus Mundi (CM-SMR/446779/2020) támogatta. Kutatásainkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA-PD115404: Lipinszki Zoltán, OTKA-K132155: Sinka Rita és OTKA-FK131961: Juhász Szilvia), a Biotechnológiai Nemzeti Laboratórium (2022-2.1.1-NL-2022-00008: Lipinszki Zoltán), valamint a Magyar Tudományos Akadémia Lendület programja (LP2017- 7/2017: Lipinszki Zoltán) támogatta.

7. Irodalomjegyzék

1. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003;21(3):255–61.
2. Ábrahám E, Réthi-Nagy Z, Vilmos P, Sinka R, Lipinszki Z. Plk4 Is a Novel Substrate of Protein Phosphatase 5. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 1;24(3).
3. Ambjørn SM, Duxin JP, Hertz EPT, Nasa I, Duro J, Kruse T, et al. A complex of BRCA2 and PP2A-B56 is required for DNA repair by homologous recombination. *Nat Commun.* 2021 Dec 1;12(1).
4. Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, Stahl M, Wanka S, Gerrits B, et al. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev.* 2009;23(16):1929–43.
5. Klipp E, Nordlander B, Krüger R, Gennemark P, Hohmann S. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol.* 2005 Aug;23(8):975–82.
6. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annual Review of Biochemistry.* 1979;48:923–59.
7. Brautigan DL. Protein Ser/ Thr phosphatases - The ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J.* 2013;280 (2):324–5.
8. Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology.* 2000;3(2):165–70.
9. Li D, Agrellos OA, Calderone R. Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. Vol. 13, *Current Opinion in Microbiology.* 2010. p. 424–30.
10. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6).
11. Bossemeyer D. Protein kinases - structure and function. Vol. 369, *FEBS Letters.* 1995. p. 57–61.
12. Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell.* 2009;139(3):468–84.
13. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell.* 2004;117:699–711.
14. Lillo C, Kataya ARA, Heidari B, Creighton MT, Nemie-Feyissa D, Ginbot Z, et al. Protein phosphatases PP2A, PP4 and PP6: Mediators and regulators in development and responses to environmental cues. *Plant Cell Environ.* 2014 Dec 1;37(12):2631–48.
15. Stanford SM, Bottini N. Targeting Tyrosine Phosphatases: Time to End the Stigma. Vol. 38, *Trends in Pharmacological Sciences.* Elsevier Ltd; 2017. p. 524–40.
16. Kobayashi M, Chen S, Gao R, Bai Y, Zhang ZY, Liu Y. Phosphatase of regenerating liver in hematopoietic stem cells and hematological malignancies. *Cell Cycle.* 2014;13(18):2827–35.
17. Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2002;59(6):941–9.

18. Pulido R, Van Huijsduijnen RH. Protein tyrosine phosphatases: Dual-specificity phosphatases in health and disease. Vol. 275, FEBS Journal. 2008. p. 848–66.
19. Lammers T, Lavi S. Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. Vol. 42, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 2007. p. 437–61.
20. Lu G, Wang Y. Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: New tales from an old family. Vol. 35, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2008. p. 107–12.
21. Tian C, Yang J, Liu C, Chen P, Zhang T, Men Y, et al. Engineering substrate specificity of HAD phosphatases and multienzyme systems development for the thermodynamic-driven manufacturing sugars. Nat Commun. 2022 Dec 1;13(1).
22. Brautigan DL, Shenolikar S. Protein Serine/Threonine Phosphatases: Keys to Unlocking Regulators and Substrates. Annu Rev Biochem. 2018;20(87):921–64.
23. Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. Vol. 24, BioEssays. 2002. p. 371–81.
24. Choy MS, Yusoff P, Lee IC, Newton JC, Goh CW, Page R, et al. Structural and Functional Analysis of the GADD34: PP1 eIF2 α Phosphatase. Cell Rep. 2015 Jun 30;11(12):1885–91.
25. Huang Y, Chen SR, Chen H, Luo Y, Pan HL. Calcineurin inhibition causes A2D-1-mediated tonic activation of synaptic NMDA receptors and pain hypersensitivity. Journal of Neuroscience. 2020 May 6;40(19):3707–19.
26. Hell JW. How Ca²⁺-permeable AMPA receptors, the kinase PKA, and the phosphatase PP2B are intertwined in synaptic LTP and LTD. 2016;9.
27. Tu MK, Levin JB, Hamilton AM, Borodinsky LN. Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. Vol. 59, Cell Calcium. Churchill Livingstone; 2016. p. 91–7.
28. Ramos F, Villoria MT, Alonso-Rodríguez E, Clemente-Blanco A. Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. Vol. 3, Cell Stress. Shared Science Publishers OG; 2019. p. 70–85.
29. Fowle H, Zhao Z, Graña X. PP2A holoenzymes, substrate specificity driving cellular functions and deregulation in cancer. In: Advances in Cancer Research. Academic Press Inc.; 2019. p. 55–93.
30. Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). Vol. 33, Trends in Biochemical Sciences. 2008. p. 113–21.
31. Brewis ND, Street AJ, Prescott AR, Cohen PTW. PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. EMBO Journal. 1993;12(3):987–96.
32. Park J, Lee DH. Functional roles of protein phosphatase 4 in multiple aspects of cellular physiology: A friend and a foe. Vol. 53, BMB Reports. The Biochemical Society of the Republic of Korea; 2020. p. 181–90.
33. Ohama T. The multiple functions of protein phosphatase 6. Vol. 1866, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Elsevier B.V.; 2019. p. 74–82.

34. Hinds TD, Sánchez ER. Protein phosphatase 5. Vol. 40, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008. p. 2358–62.
35. Genoud T, Santa Cruz MT, Kulisic T, Sparla F, Fankhauser C, Métraux JP. The protein phosphatase 7 regulates phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7).
36. Huang X, Honkanen RE. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Jan 16;273(3):1462–8.
37. Goldberg J, Huang H bin, Kwon Y guen, Greengard P, Nairn CA, Kuriyan J. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*. 1995;376:745–53.
38. Kissinger RC, Parge EH, Knighton RD, Lewis TC, Pelletier AL, Tempczyk A, et al. Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12- FK506-calcineurin complex. *Nature* . 1995;378(6557):641–4.
39. Davey NE, Cyert MS, Moses AM. Short linear motifs - Ex nihilo evolution of protein regulation Short linear motifs - The unexplored frontier of the eukaryotic proteome. Vol. 13, *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd.; 2015.
40. Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 May 23;278(21):18817–23.
41. Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PTW, Cohen P, Barford D. Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1 location, organelle or process. Vol. 16, *The EMBO Journal*. Faux and Scott; 1997.
42. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*. 2004;429(6993):780–4.
43. Wang X, Bajaj R, Bollen M, Peti W, Page R. Expanding the PP2A Interactome by Defining a B56-Specific SLiM. *Structure*. 2016 Dec 6;24(12):2174–81.
44. Hertz EPT, Kruse T, Davey NE, López-Méndez B, Sigurðsson JO, Montoya G, et al. A Conserved Motif Provides Binding Specificity to the PP2A-B56 Phosphatase. *Mol Cell*. 2016 Aug 18;63(4):686–95.
45. Li H, Rao A, Hogan PG. Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *J Mol Biol*. 2004 Oct 1;342(5):1659–74.
46. Gal M, Li S, Luna RE, Takeuchi K, Wagner G. The LxVP and PxlxIT NFAT motifs bind jointly to overlapping epitopes on calcineurin's catalytic domain distant to the regulatory domain. *Structure*. 2014 Jul 8;22(7):1016–27.
47. Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS. A Conserved Docking Site Modulates Substrate Affinity for Calcineurin, Signaling Output, and In Vivo Function. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):889–901.

48. Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, Liao J, et al. A PP4-Phosphatase Complex Dephosphorylates γ -H2AX Generated during DNA Replication. *Mol Cell*. 2008 Jul 11;31(1):33–46.
49. Oler AJ, Cairns BR. PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *EMBO Journal*. 2012 Mar 21;31(6):1440–52.
50. Torras-Llort M, Medina-Giró S, Escudero-Ferruz P, Lipinski Z, Moreno-Moreno O, Karman Z, et al. A fraction of barrier-to-autointegration factor (BAF) associates with centromeres and controls mitosis progression. *Commun Biol*. 2020 Dec 1;3(1).
51. Lee DH, Goodarzi AA, Adelmant GO, Pan Y, Jeggo PA, Marto JA, et al. Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response. *EMBO Journal*. 2012 May 16;31(10):2403–15.
52. Lee DH, Acharya SS, Kwon M, Drane P, Guan Y, Adelmant G, et al. Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell*. 2014 May 8;54(3):512–25.
53. Han X, Gomes JE, Birmingham CL, Pintard L, Sugimoto A, Mains PE. The role of protein phosphatase 4 in regulating microtubule severing in the *Caenorhabditis elegans* embryo. Vol. 181, *Genetics*. 2009. p. 933–43.
54. Hadweh P, Habelhah H, Kieff E, Mosialos G, Hatzivassiliou E. The PP4R1 subunit of protein phosphatase PP4 targets TRAF2 and TRAF6 to mediate inhibition of NF- κ B activation. *Cell Signal*. 2014 Aug 16;26(12):2730–7.
55. Chen GI, Tisayakorn S, Jorgensen C, D'Ambrosio LM, Goudreault M, Gingras AC. PP4R4/KIAA1622 forms a novel stable cytosolic complex with phosphoprotein phosphatase 4. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Oct 24;283(43):29273–84.
56. Lee DH, Pan Y, Kanner S, Sung P, Borowiec JA, Chowdhury D. A PP4 phosphatase complex dephosphorylates RPA2 to facilitate DNA repair via homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Mar;17(3):365–72.
57. Lee J, Adelmant G, Marto JA, Lee DH. Dephosphorylation of DBC1 by protein phosphatase 4 is important for p53-mediated cellular functions. *Mol Cells*. 2015 Jul 21;38(8):697–704.
58. Hastie CJ, Carnegie GK, Morrice N, Cohen PTW. A novel 50 kDa protein forms complexes with protein phosphatase 4 and is located at centrosomal microtubule organizing centres. *The Biochemical journal* . 2000;347(3):845–55.
59. LeNoue-Newton ML, Wadzinski BE, Spiller BW. The three Type 2A protein phosphatases, PP2Ac, PP4c and PP6c, are differentially regulated by Alpha4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 17;475(1):64–9.
60. Nanahoshi M, Tsujishita Y, Tokunaga C, Inui S, Sakaguchi N, Hara K, et al. Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett*. 1999 Mar 5;446(1):108–12.
61. Chen J, Peterson RT, Schreiber SL. α 4 Associates with Protein Phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochemical and Biophysical research communications*. 1998;247:827–32.

62. Karman Z, Rethi-Nagy Z, Abraham E, Fabri-Ordogh L, Csonka A, Vilmos P, et al. Novel perspectives of target-binding by the evolutionarily conserved PP4 phosphatase. *Open Biol.* 2020 Dec 1;10(12):200343.
63. Lipinski Z, Lefevre S, Savoian MS, Singleton MR, Glover DM, Przewloka MR. Centromeric binding and activity of protein phosphatase 4. *Nat Commun.* 2015 Jan 6;6.
64. Niebuhr K, Ebel F, Frank R, Reinhard M, Domann E, Carl UD, et al. A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO Journal.* 1997 Sep 1;16(17):5433–44.
65. Li D, Jackson RA, Yusoff P, Guy GR. Direct association of sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *Journal of Biological Chemistry.* 2010 Nov 12;285(46):35374–85.
66. Ball LJ, Jarchau T, Oschkinat H, Walter U. EVH1 domains: Structure, function and interactions. Vol. 513, *FEBS Letters.* 2002. p. 45–52.
67. Peterson FC, Volkman BF. Diversity of polyproline recognition by EVH1 domains. *Frontiers in Bioscience.* 2009;14:833.
68. Sousa-Nunes R, Chia W, Somers WG. Protein Phosphatase 4 mediates localization of the Miranda complex during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev.* 2009 Feb 1;23(3):359–72.
69. Ueki Y, Kruse T, Weisser MB, Sundell GN, Larsen MSY, Mendez BL, et al. A Consensus Binding Motif for the PP4 Protein Phosphatase. *Mol Cell.* 2019 Dec 19;76(6):953-964.e6.
70. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO Journal.* 2008 Feb 20;27(4):589–605.
71. Vítor AC, Huertas P, Legube G, de Almeida SF. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. Vol. 7, *Frontiers in Molecular Biosciences.* Frontiers Media S.A.; 2020.
72. Barros EM, McIntosh SA, Savage KI. The DNA damage induced immune response: Implications for cancer therapy. *DNA Repair (Amst).* 2022 Dec 1;120.
73. Sun Y, McCorvie TJ, Yates LA, Zhang X. Structural basis of homologous recombination. Vol. 77, *Cellular and Molecular Life Sciences.* Springer; 2020. p. 3–18.
74. Ceccaldi R, Rondinelli B, D’Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. Vol. 26, *Trends in Cell Biology.* Elsevier Ltd; 2016. p. 52–64.
75. Zhang F, Gong Z. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice: a new focus on 53BP1. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021 Jan 1;22(1):38–46.
76. Cannavo E, Cejka P. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature.* 2014 Oct 2;514(7520):122–5.
77. Mimitou EP, Symington LS. DNA end resection-Unraveling the tail. *DNA Repair (Amst).* 2011 Mar 7;10(3):344–8.

78. Olson E, Nievera CJ, Klimovich V, Fanning E, Wu X. RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Dec 22;281(51):39517–33.
79. Ball HL, Myers JS, Cortez D. ATRIP Binding to Replication Protein A-Single-stranded DNA Promotes ATR- ATRIP Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation. *Mol Biol Cell*. 2005;16:2372–81.
80. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science (1979)*. 2003 Jun 6;300(5625):1542–8.
81. Fan J, Pavletich NP. Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Genes Dev*. 2012 Oct 15;26(20):2337–47.
82. Haahr P, Hoffmann S, Tollenaere MAX, Ho T, Toledo LI, Mann M, et al. Activation of the ATR kinase by the RPA-binding protein ETAA1. *Nat Cell Biol*. 2016 Oct 27;18(11):1196–207.
83. Mordes DA, Glick GG, Zhao R, Cortez D. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev*. 2008 Jun 1;22(11):1478–89.
84. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;108:73–112.
85. Stauffer ME, Chazin WJ. Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jun 11;279(24):25638–45.
86. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD. Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Oct;17(10):1260–2.
87. Zhao W, Vaithiyalingam S, San Filippo J, Maranon DG, Jimenez-Sainz J, Fontenay G V., et al. Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell*. 2015 Jul 16;59(2):176–87.
88. Shahid T, Soroka J, Kong EH, Malivert L, McIlwraith MJ, Pape T, et al. Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Oct 5;21(11):962–8.
89. Shivji K.K. M, Mukund R. S, Rajendra E, Chen S, Short M. J, Savill J, et al. The BRC repeats of human BRCA2 differentially regulate RAD51 binding on single-versus double-stranded DNA to stimulate strand exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(32):13254–9.
90. Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, et al. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*. 2005;31(434(7033)):598–604.
91. Buisson R, Dion-Côté AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Oct;17(10):1247–54.

92. Zhao W, Steinfeld JB, Liang F, Chen X, Maranon DG, Jian Ma C, et al. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature*. 2017 Oct 19;550(7676).
93. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, Robert E, Iii M, Hurov KE, et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA. *Science* (1979). 2007;316(5828):1160–6.
94. Den Elzen NR, O'Connell MJ. Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO Journal*. 2004 Feb 25;23(4):908–18.
95. Bazzi M, Mantiero D, Trovesi C, Lucchini G, Longhese MP. Dephosphorylation of γ H2A by Glc7/Protein Phosphatase 1 Promotes Recovery from Inhibition of DNA Replication. *Mol Cell Biol*. 2010 Jan 1;30(1):131–45.
96. Lu Z, Wan G, Guo H, Zhang X, Lu X. Protein phosphatase 1 inhibits p53 signaling by dephosphorylating and stabilizing Mdmx. *Cell Signal*. 2013 Apr;25(4):796–804.
97. Chen BYH, Huang CH, Lin YH, Huang CC, Deng CX, Hsu LC. The K898E germline variant in the PP1-binding motif of BRCA1 causes defects in DNA Repair. *Sci Rep*. 2014 Jul 24;4:5812.
98. Yan Y, Cao PT, Greer PM, Nagengast ES, Kolb RH, Mumby MC, et al. Protein phosphatase 2A has an essential role in the activation of γ -irradiation-induced G2/M checkpoint response. *Oncogene*. 2010 Jul 29;29(30):4317–29.
99. Mazhar S, Taylor SE, Sangodkar J, Narla G. Targeting PP2A in cancer: Combination therapies. Vol. 1866, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V.; 2019. p. 51–63.
100. Wang Y, Ng TY. Phosphatase 2A Negatively Regulates Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2006;17:80–9.
101. Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GBG, et al. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO Journal*. 2004 Nov 10;23(22):4451–61.
102. Kalev P, Simicek M, Vazquez I, Munck S, Chen L, Soin T, et al. Loss of PPP2R2A inhibits homologous recombination DNA repair and predicts tumor sensitivity to PARP inhibition. *Cancer Res*. 2012 Dec 15;72(24):6414–24.
103. Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Phosphorylation of Chk1 by ATR Is Antagonized by a Chk1-Regulated Protein Phosphatase 2A Circuit. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct 1;26(20):7529–38.
104. Dozier C, Bonyadi M, Baricault L, Tonasso L, Darbon JM. Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biol Cell*. 2004;96(7):509–17.
105. Dohoney KM, Guillerm C, Whiteford C, Elbi C, Lambert PF, Hager GL, et al. Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage. *Oncogene*. 2004 Jan 8;23(1):49–57.

106. Li HH, Cai X, Shouse GP, Piluso LG, Liu X. A specific PP2A regulatory subunit, B56 γ , mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO Journal*. 2007 Jan 24;26(2):402–11.
107. O'Neill BM, Hanway D, Winzeler EA, Romesberg FE. Coordinated functions of WSS1, PSY2 and TOF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(22):6519–30.
108. Feng J, Wakeman T, Yong S, Wu X, Kornbluth S, Wang XF. Protein Phosphatase 2A-Dependent Dephosphorylation of Replication Protein A Is Required for the Repair of DNA Breaks Induced by Replication Stress. *Mol Cell Biol*. 2009 Nov 1;29(21):5696–709.
109. Hustedt N, Seeber A, Sack R, Tsai-Pflugfelder M, Bhullar B, Vlaming H, et al. Yeast PP4 interacts with ATR homolog Ddc2-Mec1 and regulates checkpoint signaling. *Mol Cell*. 2015 Jan 22;57(2):273–89.
110. O'Neill BM, Szyjka SJ, Lis ET, Bailey AO, Yates III JR, Aparicio OM, et al. Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9290–5.
111. Branzei D, Foiani M. The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation. Vol. 312, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2006. p. 2654–9.
112. Rasti G, Becker M, Vazquez BN, Espinosa-Alcantud M, Fernández-Duran I, Gámez-García A, et al. SIRT1 regulates DNA damage signaling through the PP4 phosphatase complex. *bioRxiv*. 2022 Jan 1;
113. Liu J, Xu L, Zhong J, Liao J, Li J, Xu X. Protein phosphatase PP4 is involved in NHEJ-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*. 2012 Jul 15;11(14):2643–9.
114. Blanco-Ameijeiras J, Lozano-Fernández P, Martí E. Centrosome maturation – in tune with the cell cycle. *J Cell Sci*. 2022 Jan 1;135:jcs259395(2).
115. Chen F, Wu J, Iwanski MK, Jurriens D, Sandron A, Pasolli M, et al. Self-assembly of pericentriolar material in interphase cells lacking centrioles. *Elife*. 2022 Jul 1;11.
116. Alzyoud E, Vedelek V, Réthi-Nagy Z, Lipinszki Z, Sinka R. Microtubule Organizing Centers Contain Testis-Specific γ -TuRC Proteins in Spermatids of *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 29;9.
117. Conduit PT, Wainman A, Raff JW. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Oct 25;16(10):611–24.
118. Zhao JZ, Ye Q, Wang L, Lee SC. Centrosome amplification in cancer and cancer-associated human diseases. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Aug 1;1876(1).
119. Zhang S, Hemmerich P, Grosse F. Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem*. 2007 May 15;101(2):451–65.
120. Shimada M, Komatsu K. Emerging connection between centrosome and DNA repair machinery. Vol. 50, *Journal of Radiation Research*. Japan Radiation Research Society; 2009. p. 295–301.

121. Mallery DL, Vandenberg CJ, Hiom K. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO Journal*. 2002 Dec 16;21(24):6755–62.
122. Choi E, Park PG, Lee HO, Lee YK, Kang GH, Lee JW, et al. BRCA2 Fine-Tunes the Spindle Assembly Checkpoint through Reinforcement of BubR1 Acetylation. *Dev Cell*. 2012 Feb 14;22(2):295–308.
123. Enomoto M, Goto H, Tomoro Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, et al. Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Dec 4;284(49):34223–30.
124. Shimada M, Kobayashi J, Hirayama R, Komatsu K. Differential role of repair proteins, BRCA1/NBS1 and Ku70/DNA-PKcs, in radiation-induced centrosome overduplication. *Cancer Sci*. 2010 Dec;101(12):2531–7.
125. Zou C, Li J, Bai Y, Gunning WT, Wazer DE, Band V, et al. Centrobin: A novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *Journal of Cell Biology*. 2005 Nov 7;171(3):437–45.
126. Kim JM. Molecular Link between DNA Damage Response and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 1;23(13):9686.
127. Sumiyoshi E, Sugimoto A, Yamamoto M. Protein Phosphatase 4 is required for centrosome maturation and sperm meiosis in *C. elegans*. *J Cell Sci*. 2002;115:1403–10.
128. Rocha H, Simões PA, Budrewicz J, Lara-Gonzalez P, Carvalho AX, Dumont J, et al. Nuclear-enriched protein phosphatase 4 ensures outer kinetochore assembly prior to nuclear dissolution. *J Cell Biol*. 2023;222(3):e202208154.
129. Martin-Granados C, Philp A, Oxenham SK, Prescott AR, Cohen PTW. Depletion of protein phosphatase 4 in human cells reveals essential roles in centrosome maturation, cell migration and the regulation of Rho GTPases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008;40(10):2315–32.
130. Helps R. N, Brewis D. N, Lineruth K, Davis T, Kaiser K, Cohen T.W. Patricia. Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organisation of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*. 1998;111:1331–40.
131. Gottardo M, Pollarolo G, Llamazares S, Reina J, Riparbelli MG, Callaini G, et al. Loss of Centrobin Enables Daughter Centrioles to Form Sensory Cilia in *Drosophila*. *Current Biology*. 2015 Aug 31;25(17):2319–24.
132. Reina J, Gottardo M, Riparbelli MG, Llamazares S, Callaini G, Gonzalez C. Centrobin is essential for c-tubule assembly and flagellum development in *drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Journal of Cell Biology*. 2018 Jul 1;217(7):2365–72.
133. Shin W, Yu NK, Kaang BK, Rhee K. The microtubule nucleation activity of centrobin in both the centrosome and cytoplasm. *Cell Cycle*. 2015 Jan 1;14(12):1925–31.
134. Gudi R, Zou C, Li J, Gao Q. Centrobin-tubulin interaction is required for centriole elongation and stability. *Journal of Cell Biology*. 2011 May 16;193(4):711–25.

135. Lee J, Jeong Y, Jeong S, Rhee K. Centrobilin/NIP2 is a microtubule stabilizer whose activity is enhanced by PLK1 phosphorylation during mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Aug 13;285(33):25476–84.
136. Jeong Y, Lee J, Kim K, Yoo JC, Rhee K. Characterization of NIP2/centrobilin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization. *J Cell Sci*. 2007 Jun 15;120(12):2106–16.
137. Park J, Rhee K. NEK2 phosphorylation antagonizes the microtubule stabilizing activity of centrobilin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Feb 8;431(2):302–8.
138. Gallaud E, Nair AR, Horsley N, Monnard A, Singh P, Pham TT, et al. Dynamic centriolar localization of Polo and Centrobilin in early mitosis primes centrosome asymmetry. *PLoS Biol*. 2020 Aug 6;18(8).
139. Ryu NM, Kim JM. Centrobilin plays a role in the cellular response to DNA damage. *Cell Cycle*. 2019 Oct 18;18(20):2660–71.
140. Réthi-Nagy Z, Ábrahám E, Lipinszki Z. GST-IVTT pull-down: a fast and versatile in vitro method for validating and mapping protein–protein interactions. *FEBS Open Bio*. 2022 Nov 1;12(11):1988–95.
141. Lipinszki Z, Vernyik V, Farago N, Sari T, Puskas LG, Blattner FR, et al. Enhancing the Translational Capacity of *E. coli* by Resolving the Codon Bias. *ACS Synth Biol*. 2018 Nov 16;7(11):2656–64.
142. Gunn A, Stark JM. I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. *Methods in Molecular Biology*. 2012;920:379–91.
143. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol*. 2006 Oct 31;7(10).
144. Bachrati CZ, Hickson ID. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. Vol. 374, *Biochem. J*. 2003.
145. Wechsler T, Newman S, West SC. Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. *Nature*. 2011 Mar 31;471(7340):642–6.
146. Lee S, Cavallo L, Griffith J. Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and Facilitates Their Cleavage. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1997;272(11):7532–9. Available from: <http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>
147. Liu Q, Wang L. t-Test and ANOVA for data with ceiling and/or floor effects. *Behav Res Methods*. 2021 Feb 1;53(1):264–77.
148. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. 1998 Mar 6;273(10):5858–68.
149. Ward JF, Diego S. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1988;35:95–125.

150. Russell KJ, Wiens LW, Deniers GW, Galloway DA, Plon SE, Grondine M. Abrogation of the G2 Checkpoint Results in Differential Radiosensitization of G1 Checkpoint-deficient and G1 Checkpoint-competent Cells. *Cancer Res.* 1995;55(8):1639–42.
151. Rieder CL, Palazzo RE. Colcemid and the mitotic cycle. *J Cell Sci.* 1992;102:387–92.
152. Peng A, Maller JL. Serine/threonine phosphatases in the DNA damage response and cancer. Vol. 29, *Oncogene.* 2010. p. 5977–88.
153. Stebbing J, Lit LC, Zhang H, Darrington RS, Melaiu O, Rudraraju B, et al. The regulatory roles of phosphatases in cancer. Vol. 33, *Oncogene.* 2014. p. 939–53.
154. Wang G, Dong J, Deng L. Overview of Cantharidin and its Analogues. *Curr Med Chem.* 2018 May 22;25(17):2034–44.
155. Li X, Liang L, Huang L, Ma X, Li D, Cai S. High expression of protein phosphatase 4 is associated with the aggressive malignant behavior of colorectal carcinoma. *Mol Cancer.* 2015 Apr 28;14(1).
156. Wang B, Zhao A, Sun L, Zhong X, Zhong J, Wang H, et al. Protein phosphatase PP4 is overexpressed in human breast and lung tumors. Vol. 18, *Cell Research.* 2008. p. 974–7.
157. Dong SM, Byun HJ, Kim BR, Lee SH, Trink B, Rho SB. Tumor suppressor BLU enhances pro-apoptotic activity of sMEK1 through physical interaction. *Cell Signal.* 2012 Jun;24(6):1208–14.
158. Zou C, Li J, Bai Y, Gunning WT, Wazer DE, Band V, et al. Centrobin: A novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *Journal of Cell Biology.* 2005 Nov 7;171(3):437–45.
159. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature.* 2017 May 11;545(7653):175–80.
160. Kruse T, Gnosa SP, Nasa I, Garvanska DH, Hein JB, Nguyen H, et al. Mechanisms of site-specific dephosphorylation and kinase opposition imposed by PP2A regulatory subunits. *EMBO J.* 2020 Jul;39(13).

8. Magyar nyelvű összefoglaló

A reverzibilis fehérjefoszforiláció a leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, amely számos sejt folyamatot szabályoz. Ezt a dinamikus módosítást a fehérje kinázok katalizálják, míg a fehérje foszfatázok antagonistaként működnek, megkönnyítve a foszfátcsoportok eltávolítását. Érdekes módon míg az emberi genom több mint 500 fehérje kinázt kódol, a fehérje foszfatáz aktivitással rendelkező fehérjék száma viszonylag alacsony (kb. 120). Azonban a fehérje foszfatázok kompenzálják ezt az eltérést azáltal, hogy katalitikus egységük különböző holoenzimeket alkot a regulátor fehérjékkel, ezáltal bővítve funkcionális repertoárjukat a sejtjeinkben. Ezek a holoenzimek számos sejt folyamat szabályozásában vesznek részt, beleértve az apoptózist, a sejtciklus szabályozását, a fejlődést és a jelátvitelt.

Amikor a sejtek DNS-e károsodást szenved, egy erősen szabályozott folyamat, az úgynevezett DNS-károsodásra adott válasz mechanizmus (DDR) aktiválódik, hogy megőrizze a genom integritását. A DDR számos folyamatot koordinál, beleértve a DNS lézió érzékelését, a sejtciklus megállítását és a DNS hibajavító mechanizmusok elindítását. A DNS-károsodások egyik legsúlyosabb típusának, a kettősszálú töréseknek (DSB-k) hatékony helyreállítása kritikus fontosságú a káros mutációk és kromoszóma-rendellenességek megelőzésének érdekében. Az eukarióta sejtekben a fehérje kinázok és foszfatázok közötti pontos szabályozás és koordináció elengedhetetlen a DNS hibajavítás hatékony végrehajtásához. Az olyan kinázok, mint az ATR, az ATM és a DNA-PK, a Chk1 és Chk2/RAD53 effektorokkal együtt kulcsszerepet játszanak az ellenőrzőpontok aktiválásában és a DNS hibajavításban. A kinázaktivitás egyensúlyozása és a DDR szabályozása érdekében a fehérje foszfatázok, köztük a PP1, PP2A, PP4 és Cdc14, defoszforilálják a célfehérjéket. A PP4 defoszforilál több DDR-fehérjét is, mint például az ATR-kinázt, a γ H2AX-et, a RAD53/Chk2-kinázt, az RPA2 fehérjét. Ily módon a PP4 hozzájárul az ellenőrzőpontok aktiválásához és a DNS hibajavításhoz, a sikeres javítás után pedig megkönnyíti a sejtek helyreállítását és a sejtciklus újra indulását. A fő PP4 komplex egy katalitikus (PP4c), egy állványzat (R2) és egy szabályozó (R3) alegységből áll. Az R3 szabályozó alegység felelős a célfehérjékben lévő specifikus motívumok, mint az FxxP vagy MxPP felismeréséért, lehetővé téve a szubsztrátum-felismerését, emellett a PP4 komplex szubcelluláris lokalizációját is meghatározza. Legutóbbi tanulmányunkban a *Drosophila* PP4 számos feltételezett szubsztrátumát azonosítottuk, amelyek FxxP vagy MxPP motívumokat tartalmaznak, ideértve a Centrobin (Ctb) fehérjét is.

A Ctb egy centroszómális fehérje, amely részt vesz a centriólumok megkettőződésében és érésében, valamint a mikrotubulusok dinamikájának szabályozásában. A PP4 R3 alegysége és a Ctb közötti kölcsönhatás a fajok között nagy fokú konzerváltságot mutat. Leírtuk, hogy a *Drosophila* és R3 alegység N-terminális nem-kanonikus EVH1 doménje ugyanahhoz az MxPP motívumhoz kötődik a *Drosophila* Ctb-ben (Dm-Ctb). Továbbá szakirodalmi adatok alapján maga a kötési mechanizmus is konzerváltnak bizonyul a különböző fajokban. Valamint eredményeink is arra utalnak, hogy a teljes hosszúságú humán R3 alegységek (R3A és R3B) is képesek kölcsönhatásba lépni mind a humán, mind pedig az ecetmuslica Ctb fehérjékkel, annak ellenére, hogy kis fokú szekvenciahomológiát mutatnak és a humán Ctb-ben (Hs-Ctb) egy C-terminális FxxP-t, míg az ecetmuslica Ctb-ben (Dm-Ctb) egy N-terminális MxPP-t ismer fel a PP4. Ez a kölcsönhatás csak az esszenciális FxxP és MxPP motívumok jelenlététől függ, mivel a motívumok elrontása az R3 alegységek és a Ctb-ok közötti kötési képesség elvesztéséhez vezet. Ezek a megfigyelések rávilágítanak a PP4 R3 alegység és a Ctb közötti kölcsönhatás konzervált természetére, és a kötés mechanizmusának a különböző biológiai összefüggésekben való működésére.

Először, az *in vitro* kötést szeretnénk volna igazolni *in vivo* körülmények közt is. Az *in vitro* eredmények *in vivo* kísérletes megerősítésében azonban kihívást jelentett a túlzottan expresszált teljes hosszúságú Ctb aggregációja és nem megfelelő lokalizációja a sejtekben. A probléma megoldására azonosítottuk azt a minimális hosszúságú Ctb csonkolt fehérjét, ahol hiányzik az első 180 aminosav (Flag-Ctb-180-903aa), és mégis funkcióképes, valamint centroszómális lokalizációt mutat. Ezen kívül a ko-immunoprecipitációs kísérletek azt mutatták, hogy mind a R3A, mind az R3B kötődik a Flag-Ctb-180-903aa-hoz az FRVP motívumon keresztül. Ezek az eredmények igazolják, hogy a PP4 specifikusan egyetlen FxxP motívumon keresztül köti a Flag-Ctb-180-903aa fragmentet, valamint a Flag-Ctb-180-903aa fragment alkalmazható további funkcionális vizsgálatokra.

A DNS károsodás során a Ctb-t az ATR-kináz foszforilálja, a Ctb defoszforilációjáért felelős foszfatáz ugyanakkor eddig ismeretlen volt. A γ H2AX a H2AX hiszton egyik változata, válaszul a DNS kettősszalú törésekre (DSB) foszforilálódik és a DNS-károsodás nyomon követésére használják. A γ H2AX PP4 általi defoszforilációja után a sejtciklus a DNS hibajavítást követően újraindulhat. A Ctb és a PP4 közötti kapcsolat vizsgálatára a DNS hibajavítás során az S-fázisban kísérleteket végeztünk EdU-impulzus-jelölt HeLa sejtekben. A *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* vagy *ctb* és *pp4c*

csendesítése a γ H2AX sejtmagi fókuszok szignifikáns növekedését eredményezte, ami szinergikus kapcsolatot jelez a Ctb és a PP4 között a DNS hibajavítási folyamatban. A γ H2AX tartósan magas szintje 8 óra elteltével a röntgensugárzást követően a DNS hibajavítás csökkent hatásfokát jelezte.

Emellett homológ rekombinációs repair frekvencia méréseket is végeztünk a DR-GFP U2OS riporter sejtvonallal segítségével. Ez a sejtvonall két csonka *gfp* kazettát tartalmaz, amelyek közül az egyik I-SceI felismerési helyet hordoz. Az I-SceI közvetített DSB indukálás után homológ rekombinációs repair aktiválás következtében a másik csonka *gfp* kazettát mintaként használva, a GFP expressziója helyre áll. Végül a GFP-pozitív sejtek száma határozza meg a homológ rekombinációs repair hatásfokát. Kísérleteinkben a *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* vagy *ctb* és *pp4c* együttes csendesítése a homológ rekombinációs repair jelentős csökkenését eredményezte, alátámasztva, hogy a PP4 és Ctb szerepet játszik a homológ rekombinációs repair szabályozásban.

További kísérletekben a *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* vagy *ctb* és *pp4c* depléciójának hatását vizsgáltuk röntgensugárzást követően a kromoszóma károsodások elemzésével. Megfigyeltük, hogy ezekben a mintákban megnövekedett a kromoszóma-rendellenességek száma, különösen az úgynevezett zárt kromoszómakarok (arms-closed) előfordulása, amely a Holliday junction struktúrák nem megfelelő felbontására és a testvérkromatidák összetapadására utalhat. Ennek a fenotípusnak a gyakorisága jelentősen magasabb volt a Ctb- vagy PP4-hiányos, röntgenkezelésnek kitett sejtekben, mint a kontroll csoportban. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Ctb és a PP4 együtt dolgoznak a Holliday junction struktúrák megfelelő feloldásának szabályozásában a homológ rekombinációs repair által közvetített DNS hibajavítás folyamata során.

SILAC-vizsgálat segítségével kimutatták, hogy a Ctb SQ-motívumában található Ser781 az ATM vagy az ATR kináz által foszforilálódhat (93). Ezt kiegészítve pedig a mi laborunk felfedezte, hogy az SQ motívum a Ctb PP4 kötőhelyének közelében található, amely kölcsönhatásba lép a PP4R3A és PP4R3B alegységeivel. Annak érdekében, hogy az SQ motívum és az FRVP szekvencia szerepét tudjuk vizsgálni a DNS-károsodásra adott válaszban, a Ctb különböző mutáns formáit (Ctb-771-ARVA-774, Flag-Ctb-S781A és Flag-Ctb-S781D) hoztuk létre. Munkánk során kimutattuk, hogy ezek a mutációk nem voltak hatással a Ctb és az R3A/R3B közötti kölcsönhatásra, ami arra utal, hogy az FRVP motívum szükséges a kötéshez, míg az SQ motívum nem.

További kísérletekben megvizsgáltuk a különböző Ctb-variánsok hatását a DNS hibajavítás mechanizmusában is. Ehhez a Flag-jelölt vad-típusú Flag-Ctb-180-903aa-

771-ARVA-774 (FRVP mutáns formája), Flag-Ctb-180-903aa-S781A vagy Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutánst kódoló plazmid konstrukciót és a Ctb siRNS-sel együtt transzfektáltuk, majd röntgen sugárzással kezeltük és funkcionális kísérleteket végeztünk. Röntgensugárkezelés után a kromoszóma-rendellenesség vizsgálatban a Ctb-t nem tartalmazó sejtek megnövekedett számú zárt kromoszómakarú morfológiát mutattak, amely fenotípust a vad típusú Ctb-fragment expressziója képes volt helyreállítani a vad típusú mintához hasonlítva. A különböző Flag-Ctb-180-903aa variánsok expressziója ugyanakkor nem állította helyre ezt a fenotípus változást, kimutatva a PP4 FRVP-motívumhoz való kötődésének és az SQ-motívum integritásának fontosságát a Ctb szerepében, és ezzel együtt DNS hibajavítás szabályozásában.

Összefoglalva, a reverzibilis fehérjefoszforiláció egy alapvető mechanizmus, amely szabályozza a különféle sejt folyamatokat, magába foglalva a DNS-károsodásra adott választ. Így fontos szerephez jut a fehérje kinázok és a foszfatázok összehangolt működése a genom integritásának fenntartásában, hogy a sejt elkerülje a rákos folyamatok aktiválódását. Összességében, eredményeink rávilágítanak a PP4-kötés és az SQ-motívum fontosságára a Ctb működésében a DNS hibajavítási folyamatok során.

9. Angol nyelvű összefoglaló

Reversible protein phosphorylation is the predominant posttranslational modification controlling numerous cellular processes. This dynamic modification is catalysed by protein kinases, while protein phosphatases act as antagonists, facilitating the removal of the phosphate group. Interestingly, the human genome encodes over 500 protein kinases, while the number of protein phosphatases is relatively small (approx. 120). However, catalytic subunits of protein phosphatases compensate this discrepancy by forming different holoenzymes with multiple regulators, hence expanding their functional repertoire within the cell. These holoenzymes are involved in a variety of cellular processes, including apoptosis, cell cycle regulation, development and signal transduction.

When DNA damage occurs in cells, a highly regulated system called the DNA damage response (DDR) is activated to protect the integrity of the genome. The DDR coordinates several processes, including DNA lesion detection, cell cycle arrest, and initiation of DNA repair mechanisms. Efficient repair of one of the most severe types of DNA damage, double-strand breaks (DSBs), is critical to prevent deleterious mutations and chromosomal abnormalities. Precise control and coordination between protein kinases and phosphatases is essential for the effective execution of DNA repair in eukaryotes. Kinases such as the ATR, ATM, and DNA-PK, together with their effectors Chk1 and Chk2/RAD53, play key roles in checkpoint activation and DNA repair. To balance kinase activity and regulate DDR, protein phosphatases, including PP1, PP2A, PP4 and Cdc14, dephosphorylate target proteins. In particular, PP4 dephosphorylates critical DDR proteins such as the ATR kinase, γ H2AX protein, RAD53/Chk2 kinase and RPA2 protein. In this way, PP4 contributes to checkpoint activation and DNA repair, facilitating cell recovery and cell cycle resumption after successful repair. The major form of PP4 comprises a catalytic (PP4c), a scaffolding (R2), and a regulatory (R3) subunit. The regulatory subunit (R3A and R3B isoforms in mammals) is responsible for recognizing specific consensus motifs, such as the FxxP or MxPP, in target proteins (e.g. substrates of PP4), allowing substrate recognition and directing subcellular localization of the PP4 complex. In our recent study, we identified several putative substrates of PP4 in *Drosophila* that contain FxxP or MxPP motifs, including the Ctb (Ctb) protein.

Ctb is a centrosomal protein involved in centriole duplication and microtubule dynamics. The interaction between PP4R3 and Ctb reveals intriguing cross-species conservation. We discovered that both the *Drosophila* and human R3's EVH1 domains have binding abilities to the same MxPP motif in *Drosophila* Ctb (Dm-Ctb). Remarkably, this binding mechanism remains intact even between different organisms. Furthermore, our results suggest that the full-length human R3 subunits (R3A and R3B) also have the ability to interact with both human and fly versions of Ctb, although they show a small degree of sequence homology, in the human Ctb (Hs-Ctb) PP4 recognizes a C-terminal FxxP motif and in the fly Ctb (Dm-Ctb) an N-terminal MxPP is recognized. This interaction depends on the presence of the essential FxxP and MxPP motifs, as mutation of these motifs impairs the binding ability between the R3 subunits and Ctbs. These observations highlight the conserved nature of the interaction between PP4's R3 and Ctb and shed light on the binding mechanism in various biological contexts.

First, we wanted to validate the *in vitro* binding *in vivo*. However, validating the *in vitro* results *in vivo* was challenging due to aggregation and mislocalisation of overexpressed full-length Ctb. To solve this problem, a transgenic fragment of Ctb was developed that lacks the first 180 amino acids (Flag-Ctb-180-903aa). When we overexpressed the Flag-Ctb-180-903aa it is shown solubility and centrosomal localization. Co-immunoprecipitation experiments showed that both R3A and R3B bind to Flag-Ctb-180-903aa via the intact FRVP motif. These results highlight the specific binding of PP4 to the single motif in Flag-Ctb-180-903aa and the potential of Flag-Ctb-180-903aa for functional assays.

Ctb is phosphorylated by ATR kinase in response to DNA damage. The phosphatase responsible for dephosphorylation of Ctb during DNA repair is unknown. γ H2AX is a variant of histone H2AX that undergoes rapid phosphorylation in response to DNA double-strand breaks (DSBs). This phosphorylation acts as a signal for DNA damage and facilitates the accumulation of DNA repair machinery. PP4 is responsible for the dephosphorylation of γ H2AX so that allowing the cell cycle can resume after DNA repair. To investigate the connection between Ctb and PP4 during DNA repair in S-phase, we performed experiments with EdU pulse-labelled HeLa cells. Silencing of *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* or *ctb* and *pp4c* resulted in a significant increase in γ H2AX nuclear foci, indicating a synergistic relationship between Ctb and PP4 in the DNA repair process. Sustained levels of γ H2AX 8 h after irradiation indicated a delay in DNA repair.

Furthermore, we conducted measurements to determine the frequency of homologous recombination repair using the DR-GFP U2OS reporter cell line. This particular cell line contains two truncated *gfp* cassettes, with one of them carrying an I-SceI recognition site. By inducing double-strand breaks (DSBs) through I-SceI, we activated the homologous recombination repair process. The other truncated *gfp* cassette served as a template to restore GFP expression. Ultimately, the efficiency of homologous recombination repair was determined by counting the number of GFP-positive cells. Our experimental findings revealed a significant reduction in homologous recombination when *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b*, or both *ctb* and *pp4c* were simultaneously silenced. These results provide further evidence supporting the involvement of PP4 and Ctb in the regulation of homologous recombination repair.

On the other hand, we investigated the effects of depleting *ctb*, *pp4c*, *r3a*, *r3b* or *ctb* and *pp4c* on DSB repair at the chromosome level by analysing chromosome spreading after X-ray irradiation. We observed an increased incidence of chromosome aberrations, particularly closed chromosome arms, indicating improper resolution of Holliday junction structures and retention of sister chromatids. The frequency of this phenotype was significantly higher in cells depleted of Ctb or PP4 compared to the control group. These results suggest that Ctb and PP4 work together to regulate the proper resolution of Holliday junctions during HR-mediated DNA repair.

In a recent SILAC study, Ser781 in the SQ motif of Ctb was identified as a phosphorylation site by ATM or ATR kinase. We discovered that the SQ motif is located next to the PP4 binding site of Ctb (FRVP), which interacts with the R3A and R3B subunits of PP4. To investigate the importance of the SQ motif and the FRVP sequence for the function of Ctb in responding to DNA damage, we generated mutant forms of Ctb forms (Ctb-771-ARVA-774, Flag-Ctb-S781A and Flag-Ctb-S781D). Surprisingly, the mutations had no effect on the interaction between Ctb and R3A/R3B, suggesting that the FRVP motif is necessary for binding, whereas the SQ motif is not.

We also investigated the effects of the different Flag-Ctb-180-903aa variants on the course of DNA repair. By co-transfecting cells with Flag-tagged Flag-Ctb-180-903aa or its ARVA (FRVP mutant form), Flag-Ctb-180-903aa-S781A or Flag-Ctb-180-903aa-S781D mutants, together with Ctb siRNA, we treated the cells with X-ray and then we targeted the function of these variants. After X-ray irradiation the chromosomal aberration assay showed an increased number of abnormal closed arm morphology in cells lacking

endogenous Ctb, which was restored by expression of the wild-type Ctb180-903aa fragment. However, expression of the mutant Flag-Ctb-180-903aa derivatives did not restore normal DNA repair function, highlighting the importance of PP4 binding to the FRVP motif as well as the integrity of the SQ motif in the role of Ctb in regulating DNA repair.

In summary, reversible protein phosphorylation is a fundamental mechanism that regulates cellular processes, including DNA damage response and repair. It involves the coordinated action of protein kinases and phosphatases to maintain genome integrity and prevent disease. Overall, our results highlight the importance of PP4 binding and the SQ motif for the function of Ctb during the DNA repair process.

10. Függelék

Függelék 1. A felhasznált oligonukleotid primerek

Oligonukleotid Primer	Szekvencia
Ctb_771-774-FxxPAxxAmut_fw	GCATCCAGTCTTGCCCGGGTCGCCGAGCCTCCCTCC
Ctb_771-774-FxxPAxxAmut_rev	GGAGGGAGGCTCGGGCGACCCGGGCAAGACTGGATGC
Ctb_S781A_mut_fw	GCATCCAGTCTTGCCCGGGTCGCCGAGCCTCCCTCC
Ctb_S781A_mut_rev	GGAGGGAGGCTCGGGCGACCCGGGCAAGACTGGATGC
Ctb_S781D_mut_fw	CCTCCTCCCATGCCCAAGGCAGTGGTCC
Ctb_S781D_mut_rev	GGACCACTGCCTTGGGCATGGGAGGAGG
Ctb_1_EcoRI_fw	CCTCCTCCCATGATCAAGGCAGTGGTCC
Ctb_180_Acc65I_rev	GGACCACTGCCTTATCATGGGAGGAGG
Ctb_180_EcoRI_fw	CGGAATTCGGCAACATCAGCTGACA
Ctb_460_EcoRI_fw	GAGGTACCTCAGGGATTGAGTGGAGG
Ctb_460_Acc65I_rev	GGAATTCACCCAGATTTTCAG
Ctb_903_Acc65I_rev	GGAATTCGACAGAGCGGCTG
Ctb_NotI_fw	GAGGTACCTCACACCCGCTGCTCCAG
Ctb_XbaI_rev	GAGGTACCTCATCTCCAGACTCC
R3A_GW_Stop_rev	CAGCGGCCGCAGCAACATCAGCTGAC
R3A_GW_fw	CCTCTAGACTCATCTCCAGACTCCCC
R3B_GW_Stop_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTATGAAT CAAATTTTGCTTTCTTT
R3B_GW_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGACC GACACCCGGCGGGCGGGTG
qPCR_Ctb_fw1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTATGAGC CAAGACGAGGTCTTTTC
qPCR_Ctb_rev1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCC GATACGCGGGCGGGCGAGTG
qPCR_Ctb_fw2	GCATTGGATTTCAGAGCATAAC
qPCR_Ctb_rev2	ACGGCTAATTGTTGCTGTAG
qPCR_PP4c_fw2	CCTGGGCTCAACCAAGTGTC
qPCR_PP4c_rev2	TACAGCTGGGCTCGGGCCG
qPCR_R3A_fw	AGCTGGACGAGCATCTCC
qPCR_R3A_rev	TCACAGGAAGTAGTCGGCCA
qPCR_R3B_fw	CGTCTGGCTACGTGGAGC
qPCR_R3B_rev	CCTGTTGTTTCTGGTATGCAGTGTTA
qPCR_actin_fw	ATGCGGATACGCGGGCGGC
qPCR_actin_rev	GCGACATCCCCTTGAGCTC

Függelék 2. A felhasznált kis interferáló RNS-ek (siRNS) szekvenciája

siRNA	Antiszensz	Szensz
Ctb-1	GCUCUAUGCUUCUUUGCGCtt	GCGCAAAGAAGCAUAGAGCtg
Ctb-2	CCAUGAUUGAACAAACUGGAtt	UCCAGUUGUCAAUCAUGGta
PP4c-1	UCAAGGCCUGUGCGCUAAtt	UUAGCGCACAGGGCCUUGAct
PP4c-2	GGUUACAAGUGGCACUUCAAtt	UGAAGUGCCACUUGUAACCtt
R3A-1	GCACCAUACCUACCACAUAAtt	UAUGUGGUAGGUUAUGGUGCtc
R3A-2	GCGACGGUUCUCUACUUUUtt	AAAAGUAGAGAACCGUCGtc
R3B-1	CCAUCUAUAUUGCGUAGUAAtt	UACUACGCAAUAUAGAUGGta
R3B-2	CCAAGAAUAGUGCUGAAUUtt	AAUUCAGCACUAUUCUUGGtt

Függelék 3. A humán Ctb szekvenciája. A Ctb másodlagos szerkezeti elemeit PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) szoftverrel prediktáltuk. Pirossal jelölve a vizsgált fragmentek végpontjai láthatóak. Az α -hélix félkövér és aláhúzott, a PP4 R3 FxxP felismerési motívum szürkével kiemelt, az ATR felismerési motívuma 781-SQ-782 piros betűvel írva.

MATSADSPSSPLG**AED**LLSDSSEPPGLNQV**SEVTSQLYASLR**LSRQ**AEATARAQL**YLPSTSPPE
GLDGFA**QELS**R**SL**SV**GLE**KNLKKD**GSKHIFEMES**VR**GQLQ**T**MLQ**TSRDTAYRDPLIPGAGSER
REEDSFDSSTATLLNTRPLQDLS**PSSSAQALEELF**PRYTSLRPGPPLNP **PDFQGLRDALDSEHT**
RRKHCERHI**QSLQ**TRVLE**LQQ**LAVAVA**ADR**KKDT**MIE**QLDKTLAR**VEGWNR**HEAERTEVL
RGLQEEHQAAEL**TRSKQ**QETVTRLE**QSLSEAMEALN**REQESAR**LQQR**ERETLEER**QAL**TLRLE
AEQQRCCVLQEERDAARAG**QLSEH**RELETLRAALEERQT**WAQQEHQL**KEHY**QALQ**EE**SQA**
QLEREKEKS**QRE**AQA**AW**ET**QHQL**ALVQSE**VR**LE**GE**LDTARRERDAL**QLEMS**LVQARY**ESQRI**
QLESELAV**QLE**QRV **TER**L**QAQ**ESS**LRQAAS**LR**EH**HR**KQLQ**DL**SGHQ**H**Q**ELAS**QLA**Q**FKV**
EMAEREER**QQ**VAED**YELRL**ARE**QAR**VC**EL**SG**NQ**LEEQ**R**VELVER**LQAM**L**QAH**WDEAN
QLLSTTLPPNPPAPPAGPSSPGQEPEKEERRVWTPPPMAVAL**KPVL**Q**SRE**ARDELPGAPP
VLCSSSS**DLS**LLLGP**SF**Q**SQ**HS**FQ**PLEPKD**L**TS**TAG**AF**SAL**GA**FHP**D**HRA**ERP**PF**EEDPGPDGE
GLLK**QGL**PP**PAQ**LE**GL**KN**FL**H**QL**LETVPQNNENPSVDLLPPKSGPLTVPSWEEAPQVPRIPPPVHK
TKVPL**LAM**ASSLFRVPEPPSS**SQ**SGSPSSGSPERGGDGLTF**PRQL**ME**V**S**QLL**R**L**Y**Q**ARGWGAL
PAEDLLY**LKR**LEHSGTDGRGDNVPRRNTDSRLGEIPRKEIP**SQ**AVPRRLATAPKTEKPPARKKSG
HPAPSSMR**SR**GGVWR