

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A PROTEIN FOSZFATÁZ 1-TIMAP KOMPLEX ÚJ
KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREINEK AZONOSÍTÁSA ÉS
JELLEMZÉSE ENDOTÉL SEJTEKBEN**

Péter Margit

Témavezető: Dr. Csontos Csilla



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

**A PROTEIN FOSZFATÁZ 1-TIMAP KOMPLEX ÚJ KÖLCSÖNHATÓ
PARTNEREINEK AZONOSÍTÁSA ÉS JELLEMZÉSE ENDOTÉL SEJTEKBEN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Péter Margit okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Csontos Csilla, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

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

tagok: Dr. Balla András, PhD

Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára
2017. április 10., 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A bírálóbizottság:

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

tagok: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Dr. Balla András, PhD

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2017. április 10., 13:00 óra

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciója

Az endotél sejtek (EC) egyik legfontosabb funkciója, hogy szemipermeábilis barriert képezve elválasszák a keringő vért a környező szövetektől, és szabályozzák a vérben keringő makromolekulák és sejtek átjutását az erek falán, megőrizve ezzel az érfal szelektív gátfunkcióját. A normál barrier funkciót a sejt-sejt kapcsolatok, illetve a sejt-sejt kapcsolatokban a szomszédos sejtek extracelluláris mátrixa között kialakuló kölcsönhatás biztosítja. Az endotél sejtréteg barrier funkciójának sérülésekor paracelluláris rések alakulhatnak ki, ami növekedett ér permeabilitás, végső esetben pedig elégtelen szervfunkcióhoz vezethet. Mind az EC extracelluláris mátrixához asszociálódó fehérjék, mind a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában részt vevő fehérjék reverzibilis foszforilációja/defoszforilációja módosíthatja funkcióikat, egymáshoz való asszociációjukat, szabályozva ezzel az EC barrier funkciót.

A fehérje foszforiláció és defoszforiláció hatása a vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciójára

Reverzibilis fehérje foszforiláció, a protein foszfatázok csoportosítása

A fehérjék foszforilációját protein kináz enzimek katalizálják, amely folyamat során nukleozid trifoszfátok γ -foszfátcsoportja beépül a fehérjék szerin (Ser.), treonin (Thr), tirozin (Tyr), vagy ritkábban hisztidin (His) oldalláncába. A folyamat megfordíthatóságát a protein foszfatázok biztosítják azáltal, hogy lehetővé teszik a fehérjékben az észter kötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisét. A fehérjék pillanatnyi foszforiláltsági szintjét a kináz és foszfatáz enzimek aktivitásának aránya határozza meg.

Az eukarióta protein foszfatázok három géncsalád termékei, melyek a fehérjék egy szerkezetileg és funkcionálisan diverz csoportját alkotják. Ezek közül kettő, a foszfoprotein foszfatázok (PPP) és a fémion-függő foszfatázok (PPM) a fehérjék foszfo-Ser/Thr oldalláncát, míg a tirozin foszfatázok (PTP) a foszfo-tirozin oldalláncokat defoszforilálják. A PTP családon belüli alcsalád az úgynevezett kettős specificitású protein foszfatázok (DSP), melyek a fehérjék foszfo-Ser/Thr és foszfo-Tyr oldalláncát is képesek defoszforilálni. A foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok három csoportra, azon belül további alcsoportokra bonthatók. Az első nagy csoportot a már korábban említett PPP-ok tagjai alkotják, melyek inhibitor fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján további csoportokra oszthatók: protein foszfatáz 1 (PP1), protein foszfatáz 2 (PP2), továbbá a PP4, PP5, PP6 és PP7 enzimek. Fémion függőségük alapján

a PP2 enzimek további két alcsoportra oszthatók: a PP2A enzim működéséhez nem szükséges fémion, míg a PP2B (más néven calcineurin) Ca^{2+} függő. A PPM családba a Mg^{2+} -függő PP2C és a piruvát dehidrogenáz foszfatáz tartozik. A harmadik csoportot az úgynevezett aszpartát-alapú foszfatázok alkotják.

A protein foszfatáz 1 jellemzése

A foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok egyik legjelentősebb tagja, minden eukarióta sejtben expresszálódik. Kiemelten fontos szerepet tölt be számos sejtélettani folyamatban. A sokféle biológiai funkcióval arányban áll az enzim széles szubsztrátspecifitása. Minden funkcionális PP1 enzim egy katalitikus alegységből (PP1c) és a hozzá kapcsolódó regulátor alegység(ek)ből (R) áll. Emlős sejtekben a 35-38 kDa méretű PP1 katalitikus alegységet három gén kódolja, a PP1 α , PP1 δ (más nevezéktan szerint PP1 β) és PP1 γ . Szerkezetére jellemző az aktív centrum a nagy-, és kis helikális domén és a β szendvics által létrehozott Y alakú katalitikus árokban helyezkedik el, ahol két fémion (Fe^{2+} és Mn^{2+}) található. A PP1 katalitikus alegységekhez kapcsolódó regulátor alegységgel vagy alegységekkel az így kialakult holoenzim aktivitása módosul. A PP1 enzim lehetséges regulátor alegységeinek száma 50 és 100 közé tehető. Aminosav szekvenciájuk és méretük is nagyon különböző lehet, azonban mindegyik szekvenciájában azonosítottak egy rövid motívumot (R/KVxF), amit általánosan PP1c kötő motívumnak szoktak nevezni. A PP1c kötő motívum a PP1c hidrofób árkához kötődik.

A protein foszfatáz 2A és a protein foszfatáz 2B jellemzése

A PP2A enzim minden sejtben expresszálódó foszfatáz, ami a teljes sejt-fehérje tartalom 1%-át is kiteheti. A PP1 enzimmel együtt a Ser/Thr specifikus foszfatázok 90%-át adják. Jelentőségét számos sejtélettani folyamatban leírták. A PP2A az élő sejtekben heterodimer és heterotrimer formában fordulhat elő. A dimer szerkezetű enzim egy 65 kDa nagyságú szerkezeti alegységből (A alegység vagy PR65) és a hozzá kapcsolódó 36 kDa nagyságú katalitikus alegységből (PP2A C) áll. A heterodimer forma kötődhet a variábilis regulátor alegységgel (B alegység) kialakítva ezzel az enzim heterotrimer szerkezetét.

A protein foszfatáz 2B, vagy más néven calcineurin a PPP családba tartozó Ca^{2+} /kalmodulin-függő protein foszfatáz, mely a Ca^{2+} ion kötésével válik aktív enzimé. Szerepét leírták többek között az idegrendszer fejlődésében és a memóriában, immunológiai válaszokban, izom adaptációban illetve több jelátviteli útvonalban. A PP2B egy A katalitikus alegységből (calcineurin A, CNA) és egy hozzá szorosan kapcsolódó konzerválódott Ca^{2+} -kötő B alegységből (calcineurin B, CNB) áll.

A vaszkuláris endotél sejtek közötti kapcsolatok szabályozása reverzibilis foszforilációval

Az EC-ben a sejtek között kialakuló illeszkedésben és kommunikációban fontos a transzmembrán fehérjék és a velük asszociálódó intracelluláris fehérjék foszforiláltsági állapota. A sejt-sejt kapcsolatok fontos elemei az intracelluláris fehérjék, melyek a transzmembrán membránfehérjéket a sejtek citoszkeletális szerkezetéhez kapcsolják. Az EC citoszkeleton három, monomerekből felépülő polimer fehérje hálózat (aktin filamentumok, intermedier fimalementumok, mikrotubulusok) alkotta dinamikus rendszer, mely gyors és jól szabályozott átrendeződésre képes, megszabva ezzel a sejtek alakját és motilitását. Az EC citoszkeleton endotél barrier funkcióban betöltött szerepében is kiemelten fontos a fehérjék reverzibilis foszforilációja és defoszforilációja. Az EC barrier diszfunkciójában szerepet játszó útvonalakat alapvetően két csoportra oszthatjuk: miozin könnyű lánc kináz (MLCK) –függő, és –független folyamatokra, melyekben a PP1, PP2A és a miozin foszfatáz enzimnek is fontos szerep jut.

A miozin foszfatáz enzim és regulátor alegységeinek szerepe az endotél sejtek barrier funkciójában

A miozin foszfatáz holoenzim felépítése és szabályozása

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim három alegységből épül fel: a 38 kDa nagyságú PP1c δ katalitikus alegységből és a hozzá kapcsolódó két regulátor alegységből, a 110 kDa nagyságú miozin foszfatáz regulátor alegység 1 (MYPT1) és a 20 kDa molekulatömegű M20 alegységből. A MP enzim aktivitásában fontos szerepet tölt be a regulátor alegység, a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncokon történő foszforilációja. A két oldallánc foszforilációja enzimaktivitás csökkenéshez vezet. A foszforilációt katalizáló kinázokat és a foszforiláció hatását a PP1 aktiválására sokoldalúan vizsgálták. A gátló helyek defoszforilációjában résztvevő foszfatázokról kevesebbet tudunk. A PP2A enzimről az irodalomból ismert, hogy a PP1c és MYPT gátló CPI-17 fehérjét (PKC-val aktiválódó 17 kDa-os fehérje) defoszforilálja, ami által szabályozza a MP-t. A PP2B enzimről leírták, hogy endotél sejtekben szabályozza az említett Thr oldalláncok defoszforilációját, ezzel az MLC20 foszforilációját, így fontos szerepet játszik a barrier funkció fenntartásában.

A MYPT fehérjecsalád

A MYPT fehérjecsalád tagjai közé soroljuk a MYPT1, MYPT2, MYPT3, MBS85 (miozin kötő alegység 85) és TIMAP (TGF β -gátolt membrán asszociált fehérje) fehérjéket. A MYPT1 számos szövetben jelen van, de legnagyobb mennyiségben a simaizomban expresszálódik.

Szerkezetét tekintve a MYPT1 fehérjén található egy N-terminális közeli PP1c kötő motívum (KVKF), hét ankirin ismétlődés, a C-terminális véghez közeli szabályozó/gátló Thr696 foszforilációs hely, és két nukleáris lokalizációs szignál. A fehérje C-terminális végén leucin cipzár motívum helyezkedik el. A 110 kDa molekulatömegű MYPT2 fehérje, ami a MYPT1-gyel 61%-os homológiát mutat, a vázizomban, a szívizomban és az agyban expresszálódik. A 85 kDa-os MBS85 39%-ban azonos aminosav szinten a MYPT1 fehérjével. Minden sejttípusban expresszálódik, a családon belül a MYPT2 fehérjéhez nagyon hasonló szekvenciát mutat. A főként membrán-asszociált fehérjeként leírt MYPT3 58 kDa molekulatömegű, szívben, agyban és vesében expresszálódik. A MYPT fehérjecsalád minden tagjára jellemző a PP1c kötő motívum, továbbá az N-terminális közeli konzervált ankirin ismétlődések. Az MBS85 fehérjén a MYPT1 és MYPT2-höz hasonlóan a C-terminális végén található a leucin-cipzár motívum. A MYPT3 és a TIMAP a család többi tagjától eltérően egy prenilációs motívumot (CAAX box) tartalmaznak C-terminális végükön, melynek szerepe a fehérjék membrán asszociációjához köthető.

TIMAP fehérje, a MYPT fehérjecsalád tagja

A TIMAP endotél sejtekben (azon belül is vaszkuláris endotél sejtekben) és hematopoetikus őssejtekben magas szinten expresszálódik más sejttípusokhoz képest. Szerkezeti hasonlóság alapján a MYPT fehérjecsalád tagja, leginkább a MYPT3-hoz hasonló, aminosav szinten 44,7%-os azonosságot mutatnak. A fehérje N-terminális végéhez közel található egy nukleáris lokalizációs szignál, majd a PP1c kötő motívum (KVSF). Ezt követi öt ankirin ismétlődés, majd C-terminális végén egy prenilációs motívum, a CAAX box, melynek a fehérje membrán lokalizációjában van szerepe. Szerkezeti jellegzetességeiből adódóan a TIMAP fehérje megtalálható az endotél sejtek plazmamembránjában és sejtmagjában egyaránt, bár a sejtmagi lokalizáció fiziológiai szerepe eddig nem ismert. A fehérje EC-ben a PP1c regulátor alegységeként funkcionál és a PP1c δ izomformájához kötődik specifikusan. A PP1c-TIMAP komplex szerepet játszik az EC barrier funkció fenntartásában az ERM fehérjék defoszforilációjának szabályozása által. Az irodalomból ismert, hogy a laminin receptor 1 (LAMR1) fehérje a TIMAP kölcsönható partnere, de a kölcsönhatás funkciója jelenleg nem ismert. A miozin könnyű lánc (MLC) fehérje a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja. A RACK1 (aktivált protein kináz C receptora) fehérjét munkacsoportunk azonosította, mint TIMAP kölcsönhatót. A RACK1 egy adaptor fehérje, ami endotél sejtek citoplazmájában biztosítja a TIMAP és a farnezil transzferáz enzim kölcsönhatását, ezáltal a TIMAP prenilációját melyet a TIMAP membránba történő transzlokációja követ. Munkacsoportunk további eredménye

alapján a PP1c-TIMAP holoenzim érintett az EC endotelin-1 termelésében oly módon, hogy a PKC kináz által foszforilált endotelin konvertáló enzim 1 (ECE-1) a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja.

Az eEF1A1 fehérje

Az eukarióta elongációs faktor 1 A (eEF1A) egy erősen konzerválódott fehérje. Két izoformája ismert (eEF1A1 és eEF1A2) melyek között 92%-os homológia figyelhető meg. Az eEF1A elsődleges funkciója a protein szintézis elongációs lépéséhez kötődik, ahol elősegíti az amino-acil-tRNS (aa-tRNS) GTP-függő kötődését a riboszómához. Az eEF1A részt vesz a citoszkeleton átrendeződésének szabályozásában, továbbá szerepet játszik a fehérjék proteoszóma mediált lebontásában is. Az apoptózisban és a daganatok kialakulásában betöltött szerepét mind a két izoforma esetében leírták, valamint részt vesz a vírus replikációban. A sejtmagi exportban betöltött szerepéről ismert, hogy az eEF1A1 a nukleáris envelop citoplazmatikus oldalán helyezkedik el, és az Exp5 vagy a klasszikus CRM1/NES útvonaltól függetlenül segíti elő a polyA-kötő fehérje 1 (PABP1) és a von Hippel-Lindau (VHL) fehérje nukleáris exportját anélkül, hogy belépne a sejtmagba. A PABP1 és a VHL fehérjék aminosav szekvenciájában található egy rövid peptidszakasz (DxGxxDxxL), amit transzkripció-függő nukleáris export motívumnak (TD-NEM) neveztek el, és aminek megléte esszenciális az említett fehérjék és az eEF1A1 fehérje kötődésében és a fehérjék eEF1A1 mediált sejtmagi exportjában.

A merlin fehérje

A merlin (moezin-ezrin-radixin like protein) egy tumorsuppresszor fehérje mely funkciójának elvesztése úgynevezett neurofibromatózis 2 betegség kialakulásához vezethet. Minden felnőtt, és számos embrionális humán szövetben kifejeződik, de legnagyobb mennyiségben a Schwann-sejtekben, a meningeális sejtekben és az idegekben expresszálódik. A 22q12 pozícióban elhelyezkedő *NF2* gén 17 exonból áll, a fehérjének 10 splice variánsa ismert, de a leggyakrabban előforduló és legintenzívebben kutatott az 1-es és a 2-es izoforma. A 1-es izoforma nem tartalmazza a 16-os exont, amely így rövidebb átíródott terméket eredményez a 16-os exont tartalmazó 2-es izoformához képest. A 2-es izoformában azonban a 16-os exon stop kodonnal végződik, így a merlin 2-es izoformából hiányoznak azok a C-terminális aminosavak, amelyek az intramolekuláris kölcsönhatás kialakításáért felelősek. A merlin nagyfokú szekvencia homológiát mutat a citoszkeleton-asszociált ERM fehérjékkel, melyekkel együtt a Band 4.1 fehérjecsaládba sorolják. A merlin N-terminális végén egy FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moezin) domén található, melyet az α -helikális, és végül a C-

terminális domén követ. A FERM és C-terminális domének között intramolekuláris kölcsönhatás alakulhat ki. A merlinnek fontos szerepe van a sejtek túlnövekedésének gátlásában. Konfluens sejtek esetében kölcsönhatásba lép különböző membránasszociált fehérjékkel, és ezzel szabályozni tudja a sejtmembrán mikrodomének szerveződését. A merlin a citoplazma mellett a sejtmagban is megtalálható, ahol egyrészt gátolja az onkogén génexpressziót a Hippo tumor szuppresszor útvonal aktiválásával, másrészt gátolja az CRL4^{DCAF1} E3 ubiquitin ligázt. A merlin Ser518 oldalláncon defoszforilált formában aktív, vagyis képes ellátni tumorszuppresszív funkcióját. A p21 aktivált kináz (PAK) vagy a protein kináz A (PKA) általi foszforilációja következtében azonban a fehérje tumorszuppresszív funkciója szempontjából inaktívvá válik. A korábban említett kinázok közvetlenül foszforilálják a merlint a Ser518 oldalláncon, ami feltehetően a FERM-domén és C-terminális domén között kialakuló intramolekuláris kölcsönhatás erősödéséhez vezet. Ez a szerkezeti változás vélhetően elfedi a FERM-domént, melynek következtében fehérje-kötő képessége csökken, ezáltal a downstream jelátvitel, illetve a fehérje nukleáris importja zavart szenved. A fehérje tumorszuppresszor aktivitását befolyásoló foszfo-Ser518 oldalláncot defoszforiláció foszfatázok tekintetében az ismereteink sokkal hiányosabbak. Endotél sejtekben vizsgálódva nyitott a kérdés, hogy mely foszfatáz(ok) defoszforilálhatják a merlint a Ser518 oldalláncon.

CÉLKITŰZÉSEK

A TIMAP fehérje az endotéliumban egy magas szinten expresszáldó fehérje összehasonlítva más sejttípusokkal. Az EC-ben betöltött szerepének megismerésére irányuló eddigi kutatások alapján igazolódott, hogy fontos szerepet tölt be az EC barrier funkció szabályozásában, mindezek mellett részt vesz egyéb, fontos fiziológias folyamatokban is. A TIMAP élettani funkcióiáról a legtöbb ismeretünket a kölcsönható partnereinek megismerése által nyertünk, melyek alapján az endotél sejtekről szerzett ismereteink egyre bővülnek. Ezért munkánk során a TIMAP fehérje korábban nem ismert kölcsönható partnereinek azonosítását és vizsgálatát terveztük vaszkuláris endotél sejtekben.

Ehhez célul tűztük ki:

I.

- A TIMAP fehérje új kölcsönható partnerének azonosítását endotél sejtekben.
- A fehérjék közötti kölcsönhatás szerkezeti elemzését.
- A kölcsönhatás fiziológiai szerepének megismerését.

II.

- Az ERM fehérjékkel rokon merlin és a TIMAP kölcsönhatásának detektálását vaszkuláris endotél sejtekben.
- A fehérjék közötti kölcsönhatás szerkezeti elemzését.
- A PP1c-TIMAP komplex lehetséges szerepének vizsgálatát a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Reagensek és vegyszerek

A reagenseket és vegyszereket a Sigma (St Louis, MO, USA) cégtől szereztük be, ha másképp nincs jelölve.

Módszerek

Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncerteakció (PCR)

Az endotél sejtekből totál RNS-t izoláltunk ZR RNA MicroPrep™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) segítségével a gyártó utasítása szerint. A PCR reakciókhoz Phire® vagy Phusion® DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) használtunk.

Plazmidok, klónozás

Klónozás során pGEX-4T-2, pGEX-4T-3 bakteriális és pCMV-Myc emlős expresszióra alkalmas vektorokat (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) használtunk.

Agaróz gélelektroforézis, a DNS kinyerése agaróz gélből

A DNS darabok elválasztására 1-1,2%-os agaróz gélét használtunk. A kivágni kívánt fragmenteket UV asztal (Hoefer Inc., Holliston, MA, USA) fölött távolítottuk el a gélből. A DNS-t GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) alkalmazásával nyertük ki a gélből a gyártó utasításait követve. Az elúciót 55°C-on 30 µl nukleáz-mentes vízzel végeztük, majd a DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg.

Restrikciós emésztés és ligálás

A restrikciós hasításhoz a Thermo Fischer Scientific cég (Waltham, MA, USA) FastDigest enzimeit (BamHI: GˆGATCC, EcoRI: GˆAATTC, NotI: GCˆGGCCGC, SalI: GˆTCGAC, XhoI: CˆTCGAG) használtuk a gyártó előírásai szerint, 10x FastDigest puffert alkalmazva. Az enzimek mennyisége nem haladta meg a teljes reakcióközeg 10%-át. Ligálás során 1 : 3 = vektor : inzert moláris arányt alkalmaztunk. A ligálási elegyben öt egység DNS T4 Ligáz (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) enzimet, és a gyártó által biztosított puffert használtunk. A ligálást szobahőmérsékleten 1 órán át végeztük.

Kompetens sejtek előállítása és transzformálása

Az *E. coli* tenyészet (JM109 vagy BL21 (DE3)) egyetlen telepét 3 ml LB tápfolyadékba oltottuk, és egy éjszakán át 37°C-on 180 rpm-en rázatva tenyésztettük. Másnap a kultúrát LB tápfolyadékban 1:100 arányban hígítottuk, és OD₆₀₀=0,3-0,5-ig tenyésztettük. Ezután a baktérium kultúrát jégre helyeztük 10 percre, majd centrifugáltuk 2500 g-n 5 percig 4°C-on. A sejteket tartalmazó pelletet 30 ml 100 mM-os CaCl₂ (pH 7,4) oldatban szuszpendáltuk, majd jégen inkubáltuk 30 percig, amit ismét centrifugálás követett. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet pedig 3 ml hideg 100 mM-os CaCl₂ (pH 7,4) oldatban szuszpendáltuk fel. Az így kapott szuszpenziót 400 µl-ként steril csövekbe pipettáztuk 15% steril glicerollal kiegészítve. A sejteket -70°C-on tároltuk. Transzformálás esetén a plazmidokat, vagy a ligálási elegyet 100 µl jégen felolvasztott kompetens sejthez adtuk, és 20 percen át jégen inkubáltuk, 45 másodpercig 42°C-os hőszököt alkalmaztunk, majd a mintákat ismét jégre helyeztük 2 percig. A sejtekhez 900 µl SOC médiumot adtunk, és ferdén elhelyezve 180 rpm-en, 45 percig, 37°C-on ráztattuk. Ezt követően a sejteket ampicillin antibiotikum tartalmú LB-agar táptalajra szélesztettük. A konstruktot nem tartalmazó kontroll mintát antibiotikumot tartalmazó, és antibiotikum mentes LB-agar táptalajra is szélesztettük. A lemezeket 16 órán át 37°C-os termosztátban inkubáltuk.

Plazmid preparálás

A plazmid DNS-t tartalmazó baktérium tenyészet egyetlen telepét 3 ml antibiotikum tartalmú LB tápfolyadékba oltottuk, és egy éjszakán át 37°C-on 180 rpm-en rázatva tenyésztettük. A plazmid kinyeréséhez GeneJET Plazmid Miniprep kitet (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) használtunk a gyártó utasításai szerint. Az izolált plazmid DNS koncentrációját NanoDrop 2000 Spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) határoztuk meg.

DNS szekvenálás

A klónok ellenőrzése végett a beépült inzertek szekvenciáját DNS szekvenálással ellenőriztük. A szekvenálás a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszékének Molekuláris Genetikai Laboratóriumában készült a laboratóriumban beállított protokoll szerint.

GST-fúziós fehérjék előállítása

A rekombináns fehérjék expressziója során minden esetben 100 µg/ml végkoncentrációjú ampicillin antibiotikumot használtunk. Az expresszió során elsőként a megfelelő plazmidot tartalmazó baktériumokat LB-agar táptalajra szélesztettük és 16 órán át tenyésztettük 37°C-on.

Az agarlemezről egy különálló telepet 3 ml 2xYT tápfolyadékba oltottunk és 16 órán át 37°C-on 180 rpm-en rázatva tenyésztettük, majd a tenyészet 200 µl-ét 10 ml-re hígítottuk, és 2 órán át ráztuk ($OD_{600} = 0,5-0,6$). A rekombináns fehérjék expresszióját 0,1-1 M IPTG koncentrációval, 25°C vagy 37°C-on végeztük minden esetben 3 órán keresztül. Az inkubációs idő után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (5000 g, 10 perc). A pelletet 1xPBS-sel mostuk, mikorcentrifuga csövekbe szétosztottuk, ismét centrifugáltuk, majd a pelletet -70°C-ra helyeztük.

Az endotél sejtek tenyésztése

A kísérletekhez használt marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC, Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cell) a 8. passzálásnál vásároltuk meg az American Type Culture Collection-től (sejtvonal: CCL 209) és a 15-22 passzálás között használtuk fel. A sejteket 10% hőinaktivált FBS, 1% nem-esszenciális aminosav és 1% Na-piruvát tartalmú, minimal essential médiumban (MEM) tenyésztettük 37°C-on 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában.

Immunprecipitáció

Immunprecipitációs kísérletekhez az endotél sejteket 100 mm átmérőjű sejtenyésző edénybe passzáltuk a kísérlet kezdete előtt 24 órával. Felhasználás előtt a sejteket háromszor mostuk hideg 1xPBS-sel, majd 600 µl IP pufferben kapartuk fel őket. A sejteket 4°C-on szonikáltuk 20 másodpercig, majd 12000 g-n, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszóhoz IP pufferrel mosott 50 µl Protein G Sepharose gyantát (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) adtunk és 3 órán át 4°C-on forgattuk az aspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítása végett. A gyantát centrifugálással eltávolítottuk, majd felülúszót a megfelelő specifikus antitesttel inkubáltuk 1 órán át 4°C-on. Ezután 50 µl friss Protein G Sepharose gyantával 1 éjszakán át 4°C-on forgattuk. A mosási lépéseket követően a mintákat 1xSDS mintapufferben főztük.

Endotél sejtek transzfekciója

BPAE sejtek transzfekciója pCMV-Myc TIMAP 1-257 wt és pCMV-Myc 1-257 TIMAP G252A mutáns plazmiddal történt Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. 24 óra után a sejtek mosása 1xTBS-sel történt, majd immunfestéshez, vagy szubcelluláris frakcionáláshoz lettek felhasználva.

A TIMAP csendesítése 50 nM ON-TARGET plus SMARTpool siRNS-sel (L-004065-00-0, Dharmacon, Lafayette, CO, USA), az eEF1A1 csendesítése pedig 10 nM EF-1 α 1 siRNS-sel (sc-77232, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) történt. Az siRNS-ek

inkubálása Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történt a gyártó utasításai szerint. A komplexet inkubációja szobahőmérsékleten történt. A sejtekkel történő inkubáció szérummentes médiumban, 6 órán keresztül zajlott. Ezt követően a sejtek tenyésztése komplett médiumban történt további 48 órán át 37°C-on 5% szén-dioxidot tartalmazó termosztátban. Kontrollként ONTARGETplus siCONTROL nontargeting pool (D-001810-10-01-05; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) siRNS volt alkalmazva.

Szubcelluláris frakcionálás

BPAE sejtek szubcelluláris frakcionálása ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit, illetve Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) felhasználásával történt a gyártó utasításai szerint. A frakcionálás hatékonyságának ellenőrzésére specifikus CD31 elleni antitest (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA), mint membrán marker, specifikus β -tubulin elleni antitest (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), mint citoplazma marker, és specifikus lamin A/C elleni antitest (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), mint sejtmag marker volt alkalmazva Western blot kísérletben.

Immunfestés és konfokális mikroszkópia

Immunfestéshez a sejtek tenyésztése 0,2%-os zselatinnal előkezelte üveg lemezeken történt. A médium eltávolítása és a mosási lépéseket követően a sejtek fixálása 3,7%-os paraformaldehidet tartalmazó 1xTBS-sel történt 15 percen át, a permeabilizálás 0,5% Triton X-100-at tartalmazó 1xTBS pufferrel 15 percig, a blokkolás pedig 2%-os BSA TBS-ben oldott oldatával történt 30 percig. Az elsődleges és másodlagos antitestekkel történő inkubáció 1 órán át, sötétben zajlott. Minden kísérleti lépés szobahőmérsékleten zajlott. A sejtmag festésére DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) vagy TO-PRO-3 Iodide (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) lett alkalmazva 1:1000 x hígításban. Az egyes lépések között az üveglemezek mosása 3x történt 1xTBS-sel. A lemezek tárgylemezre rögzítése ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) médium felhasználásával történt, majd a képek elkészítése Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópon (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország), HC PL APO CS2 63 x 1.40 NA oil immerziós objektívvel, DMI6000 mikroszkópon, 25°C-on történt. A képek feldolgozására LAS AF v3.1.3 szoftver került felhasználásra. A másodlagos antitestek nem-specifikus kötődése kontroll kísérletekben lett ellenőrizve.

SDS-PAGE és Western blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását 10-12%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel Bio-Rad készüléken végeztük. A géleken a szétválasztott fehérjesávokat Coomassie Brilliant Blue vagy Blue Silver festéssel detektáltuk. Western blot esetében a molekulatömeg szerint elválasztott fehérjéket 0,45 µm pórusméretű Hybond ECL nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeinek blokkolását 5%-os sovány tejpor 1xTBST pufferben oldott oldatával végeztük 1 órán át szobahőmérsékleten. A blokkolást követően a membránt a vizsgált fehérje ellen termeltetett specifikus antitesttel egy éjszakán át 4°C-on, majd a megfelelő, peroxidázzal jelzett másodlagos antitesttel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az egyes lépések között a membránt 1xTBST-vel mostuk 3 x 5 percig. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk WesternBright ECL-HRP substrate (Advansta Inc., Menlo Park CA, USA) oldattal Alpha Innotech FluorChem® FC2 Imager (Lab Merchant, London, Egyesült Királyság) készülékkel.

Affinitás kromatográfia és in vitro GST pull down assay

A GST címkével fuzionált fehérjéket tartalmazó baktérium sejteket 600 µl hideg lízis pufferben tártuk fel, jeges vízben szonikáltuk 1 percig, majd a sejtlyázatot 12000 g-n, 20 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A GST-TIMAP 1-257 és GST-TIMAP 1-257 G525A konstruktokat tartalmazó baktérium sejtek feltárása ettől eltér: azokat 0,2% szarkozil tartalmú lízis pufferben tártuk fel, majd a centrifugálási lépést követően a minták felülúszóját úgy hígítottuk lízis pufferrel, hogy a szarkozil koncentrációja 0,008% legyen. Minden feltárt fehérje esetében a felülúszóhoz 50 µl 1xTBST-vel mosott glutathinone Sepharose 4B gyantát (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) adtunk, és 4°C-on forgatással immobilizáltuk a fehérjét. A nem kötődött fehérjéket mosással távolítottuk el, majd a gyantát 1xSDS mintapufferben főztük és a mintákat SDS-PAGE-sel vizsgáltuk. Pull down kísérletek esetében a gyantára immobilizált GST címkével ellátott fehérjéket mostuk a nem kötődött fehérjék eltávolítása céljából, majd BPAE sejtlyázattal inkubáltuk. A BPAE sejteket hideg 1xPBS-sel mostuk, majd 600 µl hideg lízis pufferben felkapartuk, 20 másodpercig jeges vízben szonikáltuk, ami után 15 percig 12000 g-n, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót a gyantán kikötődött fehérjéhez adtuk, és egy éjszakán át 4°C-on forgattuk. A mosási lépéseket követően a mintákat 1xSDS mintapufferben főztük 10 percig.

Az endotél sejtek specifikus foszfatázgátló kezelése

BPAE sejteket specifikus foszfatázgátlókkal kezeltünk 30 percen keresztül. A PP1 gátlása érdekében 1 μ M tautomycin-nel, a PP2A gátlása érdekében 5 nM okadaic acid-val, míg a PP2B gátlása végett 2 μ M ciklosporin A-val kezeltük a sejteket. Kontrollként (vehikulum) DMSO kezelést alkalmaztunk. A kezeléseket követően a sejteket lízis pufferben felkapartuk, majd 1xSDS mintapufferben főztük 10 percig.

LC-MS/MS analízis

A GST pull down kísérletet követően a fehérjéket SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd Blue Silver oldattal festettük. Az analízisre szánt fehérjesávokat tartalmazó géldarabokat kivágtuk, és tömegspektrometriás elemzésre küldtük Dr. Janáky Tamásnak a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetébe. Az eredmények értékelése ProteinLynx GlobalServer 2.4 (Waters, Milford, MA, USA) és Mascot 2.04 (Marrix Science, Boston, MA, USA) szoftverrel történt.

Statisztikai analízis, az adatok kiértékelése

A statisztikai elemzést SigmaStat (Systat Software Inc., London, Egyesült Királyság) programmal ANOVA analízissel végeztük. A szignifikancia szintváltozásokat csillaggal jelöltük: *** ($P < 0,001$). A Western blot kísérletek során nyert fehérjesávok intenzitását ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) szoftverrel értékeltük ki.

EREDMÉNYEK

A TIMAP új kölcsönható partnerének azonosítása

Az eEF1A1 a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben

A TIMAP fehérje endotél sejtekben magas szinten expresszálódik más sejtípusokhoz képest, a szerepéről azonban még mindig kevés információ áll rendelkezésünkre, bár az elmúlt években több TIMAP kölcsönható partnert is azonosítottunk. Munkánk során további TIMAP kölcsönható partnerek keresését végeztük endotél sejtekben. Ehhez GST címkével ellátott overexpresszált TIMAP fehérjét glutatione Sepharose 4B gyantához immobilizáltunk, majd a kikötődött fehérjét BPAE sejtlyázattal inkubáltuk. Kontrollként két féle mintát használtunk: az első kontroll minta esetében immobilizált GST fehérjéhez BPAE sejtlyázatot adtunk, a második kontroll minta esetében pedig a bakteriálisan overexpresszált TIMAP fehérjét immobilizáltuk glutatione Sepharose 4B gyantához majd lízis pufferrel inkubáltuk. A mosási lépéseket követően a gyantáról a kikötődött fehérjéket 1xSDS minta pufferben való főzéssel eluáltuk. A mintáinkat SDS-poliakrilamid gélen méret szerint szétválasztottuk, Blue Silver festékkel festettük, és az endotél sejtlyázattal inkubált TIMAP eluátumban a kontroll mintákhoz képest extraként jelentkező sávot kivágtuk, és LC-MS/MS analízisre küldtük (Dr. Janáky Tamás, Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézet). Az analízis során az 50 kDa nagyságú eukarióta elongációs faktor 1 A1 (eEF1A1) fehérjét azonosították (gén: *EEF1A1*, UniProtKB azonosító szám: P68104). Ezután GST címkével ellátott overexpresszált eEF1A1 fehérjét glutation Sepharose 4B gyantához immobilizáltunk, majd a kikötődött fehérjét BPAE sejtlyázattal inkubáltuk. Kontrollként olyan mintát használtunk ahol immobilizált GST fehérjét BPAE sejtlyázattal inkubáltunk. A TIMAP és az eEF1A1 fehérjék kölcsönhatását a pull down minták Western blot analízisével megerősítettük specifikus TIMAP, illetve eEF1A1 elleni antitestekkel. Az endogén fehérjék közötti kölcsönhatást immunprecipitációs kísérletben vizsgáltuk. A TIMAP immunprecipitátumában kimutattuk az eEF1A1 fehérjét, és fordítva, az eEF1A1 immunprecipitátumában a TIMAP-ot. Munkacsoportunk korábbi eredményeiből ismert, hogy a TIMAP a PP1c δ regulátor alegysége endotél sejtekben, ezért az immunprecipitátumokban a PP1c jelenlétét is vizsgáltuk. A TIMAP mellett az eEF1A1 immunprecipitátumában is detektálni tudtuk a PP1c-t, ami az eEF1A1 és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatására enged következtetni.

Az eEF1A1 a TIMAP kölcsönhatásának szerkezeti elemzése

A két fehérje közötti kölcsönhatás pontosabb megismerése érdekében a következőkben megvizsgáltuk, hogy a TIMAP mely részén keresztül kötődik az eEF1A1 fehérjéhez. Kísérleteink során elsőként különböző GST-TIMAP rövidített fehérjéket (1-567 aminosav (teljes hosszúságú TIMAP), 1-165 aminosav, 1-290 aminosav, 165-290 aminosav és 291-567 aminosav) használtunk pull down kísérletben, és az eluátumokat Western blottal vizsgáltuk specifikus eEF1A1 elleni antitest felhasználásával. Azt tapasztaltuk, hogy az eEF1A1 fehérje a teljes hosszúságú TIMAP (1-567 aminosav) fehérjén kívül csak azokhoz a TIMAP fragmentumokhoz kötődött, melyek a fehérje 4-es és 5-ös ankirin ismétlődését tartalmazzák. Irodalmi adatokból ismert, hogy az eEF1A1 fehérje szerepet játszik több fehérje sejtmagi exportjában, és hogy a szóban forgó fehérjék és az eEF1A1 kölcsönhatásában, valamint eEF1A1 mediált nukleáris exportjukban szükséges egy úgynevezett TD-NEM motívum megléte. A TIMAP szekvenciájának gondos elemzését követően kiderült, hogy ebben a régióban, a 250-260 aminosav közötti szakaszon található egy olyan szekvencia részlet, ami a TIMAP TD-NEM motívumának felelhet meg (TD-NEM: **DxGxxDxxL**, TIMAP: ²⁵⁰**DHGVRVDVKDW**₂₆₀).

A TD-NEM motívum szerepe a TIMAP és az eEF1A1 kölcsönhatásában

Az előző alfejezetben leírtak tükrében felmerült a kérdés, hogy a TIMAP TD-NEM motívumának szerepe van-e az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásban. Az irodalomban arról is beszámoltak, hogy az eEF1A1 és a TD-NEM motívumot tartalmazó fehérjék kölcsönhatásában és a nukleáris exportjukban a TD-NEM első két konzervált aminosavának van a legnagyobb szerepe. Az interakcióban leginkább a második konzervált aminosav, a glicin (G) alaninra (A) történő változtatása volt hatással. Mi is megvizsgáltuk a mutáció hatását az eEF1A1 és TIMAP kölcsönhatásban. Létrehoztunk két TIMAP rövidített konstruktot. A vad típusú TIMAP 1-257 konstrukt a fehérje 1-257 aminosavát kódolta, míg a mutáns TIMAP 1-257 G252A konstrukt a 252. aminosav esetében glicin helyett alanint kódolt. A sikeresen overexpresszált vad típusú és mutáns TIMAP 1-257 fragmentumokat affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A gyantáról eluált minták esetében egy sávot detektáltunk a GST-TIMAP vad típusú és mutáns overexpresszált fehérjének megfelelően, ami a tisztítás sikerességét bizonyítja. A GST-vel fuzionált rövidített vad típusú és mutáns fragmentumokat pull down kísérletben vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a glicin helyett alanint tartalmazó mutáns TIMAP fragmentumhoz az eEF1A1 nem tudott kötődni, míg a vad típusú rövidített fehérjéhez igen. Ez az eredmény azt igazolja, hogy a TIMAP TD-NEM szerű motívumának fontos szerepe van a

két fehérje közötti kölcsönhatásban, a TD-NEM motívum konzervált aminosavában bekövetkezett mutáció megakadályozta az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatását.

Ezután, a vad típusú és a G252A mutáns TIMAP 1-257 aminosavát kódoló szekvenciát pCMV-Myc vektorba szubklónoztuk és emlős sejtekben expresszálnak plazmidokat hoztunk létre. A plazmidokat munkacsoportunk tagjai BPAE sejtekbe transzfektálták és specifikus c-myc elleni antitest felhasználásával immunfluoreszcens festést végeztek, majd a mintákban konfokális mikroszkóppal megvizsgálták a rövidített fehérjék sejtben belüli lokalizációját. Az eredmények alapján a vad típusú és a mutáns konstrukció is megjelent a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt, de a G252A mutáns fehérje a sejtmagban jelentősebb mértékben volt detektálható. A BPAE sejtek szubcelluláris frakcionálását követően munkacsoportunk tagjai Western blotol is vizsgálták a rövidített vad típusú és mutáns TIMAP lokalizációját specifikus c-myc elleni antitest felhasználásával. A frakcionálás ellenőrzése céljából citoplazma markerként specifikus β -tubulin elleni, sejtmag markerként specifikus lamin A/C elleni, míg membrán markerként specifikus CD31 elleni antitest lett felhasználva. A TIMAP membránba történő lokalizációjának előfeltétele a fehérje prenilációja. Mivel a rövidített plazmidok nem kódolták a TIMAP prenilációs motívumát, így – ahogy az várható volt – sem a rövidített vad típusú, sem a rövidített G252A mutáns fehérje nem volt detektálható a plazmamembránban. A vad típusú és a mutáns rövidített fehérjék citoplazmatikus/sejtmagi eloszlását megvizsgálta az volt tapasztalható, hogy míg a vad típusú rövidített fehérje körülbelül 50-50%-ban oszlott meg a citoplazmában és a sejtmagban, addig a mutáns rövidített fehérje döntően a sejtmagban lokalizálódott, 20%-ban a citoplazmában, míg 80%-ban a sejtmagban volt jelen.

Az eEF1A1 fehérje szerepe a TIMAP sejtmagi exportjában

Az eEF1A1 fehérjének a TIMAP sejtmagi exportjában betöltött lehetséges szerepének vizsgálatára munkacsoportunk tagjai specifikus siRNS felhasználásával eEF1A1 csendesítést hajtottak végre BPAE sejteken. Kontrollként olyan sejtek voltak használva, amelyek nem-specifikus siRNS kezelést kaptak. A csendesített sejtekből citoplazma, sejtmag és membrán frakció lett izolálva szubcelluláris frakcionálással. A frakciókat Western blot kísérletben vizsgálták specifikus eEF1A1 és TIMAP elleni antitestek felhasználásával. A frakciók tisztaságának ellenőrzésére specifikus CD31 elleni antitestet, mint membrán marker, specifikus β -tubulin elleni antitestet, mint citoplazma, és specifikus lamin A/C elleni antitestet, mint sejtmag markert használtak. A csendesítés sikerességét jelzi, hogy az eEF1A1 fehérje nem volt detektálható a specifikus siRNS-sel kezelt mintákban. A kontroll, nem specifikus siRNS-sel kezelt minták citoplazma, sejtmag és membrán frakciójában is megjelent az eEF1A1 fehérje.

Ugyanakkor, a várt eredménytől eltérően a TIMAP fehérjét nem csak a kontroll, nem specifikus siRNS-sel kezelt miták citoplazma és membrán frakcióiban lehetett detektálni, hanem az eEF1A1 depletált minták citoplazma és plazmamembrán frakcióiban is. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy bár a TIMAP TD-NEM motívumának valóban fontos szerepe van az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásában, de a TIMAP sejtmagi exportjában nem az eEF1A1, vagy nem kizárólag vesz részt.

A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának vizsgálata

Az ERM fehérjék és a TIMAP kölcsönhatását munkacsoportunk már korábban leírta, és igazolta, hogy a PP1c-TIMAP komplex részt vesz az endotél barrier szabályozásában az ERM fehérjék defoszforilációján keresztül. Az ERM fehérjékkel rokon merlin Ser518 oldalláncon történő PAK/PKA mediált foszforilációja befolyásolja a fehérje biológiai aktivitását. A defoszforilációt végző foszfataz enzimet/enzimeket endotél sejtekben még nem vizsgálták.

Merlin izoformák vizsgálata vaszkuláris endotél sejtekben

A merlin fehérjének 10 izoformája ismert, de a sejtekben legnagyobb mennyiségben kifejeződő és legintenzívebben kutatott az 1-es és a 2-es izoforma. A két izoforma között 45 bp különbség van (merlin 1-es izoforma kódoló szekvencia: 6046, merlin 2-es izoforma kódoló szekvencia: 6091 bp). Megvizsgáltuk, hogy az endotél sejtekben az 1-es, vagy a 2-es, esetleg mindkét merlin izoforma kifejeződik-e. Ennek eldöntésére olyan primerpárt terveztünk, amely a 2-es izoformában kifejeződő 16-os exont közrefogja. A 16-os exon megléte/hiánya következtében egy 45 bp-nyi különbség várható a két izoforma között. A primerek által közrefogott termék az 1-es izoforma esetében 493 bp, míg a 2-es izoforma esetében 538 bp. A primerpárral PCR-t végeztünk HPAEC (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) cDNS-t használva templátként. Negatív kontrollként olyan reakciót állítottunk össze, amelyben a cDNS-t nukleáz mentes vízzel helyettesítettük. A PCR termékeket agaróz gélen futtatuk, majd a DNS-be interkalálódott GelRed festéket UV asztal fölött vizsgáltuk. Az endotél cDNS-ből végzett PCR termékben két sávot kaptunk, melyek mérete a merlin 1-es és 2-es izoformának felel meg, bizonyítva azt, hogy endotél sejtekben mind az 1-es, mind a 2-es merlin izoforma kifejeződik. További kísérleteinkhez a merlin 1-es izoformáját használtuk. A merlin 1-es izoformáját kódoló DNS szakaszt felszoroztuk és pGEX-4T-2 vektorba klónoztuk. A plazmidot szekvenálással ellenőriztük.

A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának detektálása

A merlin és a PP1c-TIMAP komplex közötti kölcsönhatást pull down kísérlettel vizsgáltuk. Az overexpresszpresszált merlin, illetve TIMAP fehérjéket glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd BPAE sejtlyizátummal inkubáltuk. A totál sejtlyizátumot és a pull down mintákat Western blottal vizsgáltuk specifikus eEF1A1, TIMAP, illetve PP1c elleni antitestekkel. Eredményeink alapján a merlin és a TIMAP kölcsönhatnak egymással endotél sejtekben, továbbá a pull down mintákban a PP1c enzim jelenlétét is detektálni tudtuk, mely igazolja, hogy a merlin kölcsönhatásba lép a PP1c-TIMAP holoenzimmal. Munkánk következő lépéseként az endogén fehérjék kölcsönhatását vizsgáltuk vaszkuláris endotél sejtekben. A merlin immunprecipitátumában detektáltuk a TIMAP fehérjét, és fordítva, a TIMAP immunprecipitátumában a merlint. A pull down kísérletekkel egybehangzón az IP mintákban is detektáltuk a merlin illetve a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatását. Mindezek mellett kíváncsiak voltunk, hogy a TIMAP kötődik-e a merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formájához. A TIMAP immunprecipitátumában sikeresen detektáltuk a foszfo-Ser518-merlin fehérjét, ami arra enged következtetni, hogy a TIMAP-nak szerep lehet a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában.

A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának feltérképezése

A két fehérje kölcsönhatásának feltérképezése érdekében pull down kísérleteket végeztünk. Elsőként a TIMAP oldaláról kívántuk feltárni az interakciót. Ehhez a laboratóriumunkban rendelkezésre álló teljes hosszúságú vad típusú (1-567 aminosav) mellé a többféle rövidített GST-TIMAP fragmentum közül a fehérje N-, és C-terminális régióját lefedő konstruktokat választottuk. A teljes hosszúságú, az N-terminális és a C-terminális TIMAP fragmentumokat glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd a gyantára kikötődött fehérjéket BPAE sejtlyizátummal inkubáltuk. A totál sejtlyizátumot és a pull down mintákat Western blot kísérletben vizsgáltuk specifikus merlin elleni antitest felhasználásával. A kísérlet eredménye alapján, – ahogy az várható volt – a teljes hosszúságú TIMAP fehérje kötődött a merlinhez, továbbá kimutattuk, hogy a kölcsönhatásban a TIMAP N-terminális fele érintett. A fehérjének ezen fele rendezett szerkezetet mutat ellentétben a C-terminális felével. Itt található a TIMAP nukleáris lokalizációs szignálja, a PP1c kötő motívum továbbá a fehérje-fehérje kölcsönhatásokért felelős ankirin ismétlődések és elmondható, hogy az eddig leírt TIMAP kölcsönható partnerek döntően a fehérje ezen feléhez kapcsolódnak. Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex melyik merlin domén(ek)hez kapcsolódik. A merlin fehérje három doménból áll, melyek az N-terminális, az α -helikális, valamint a C-

terminális domén. Annak eldöntésére, hogy a merlin melyik doménje(i) kötik a PP1c-TIMAP komplexet merlin FERM-domén, α -helikális domén és C-terminális domén rekombináns fehérjéket hoztunk létre. Első lépésként a merlin fehérje doménjeit kódoló rekombináns plazmidokat állítottuk elő, ahol templátként a korábban előállított teljes hosszúságú vad típusú merlin plazmid szolgált. Ezt követően a GST-vel fúzionált FERM, α -helikális és C-terminális merlin domén fragmentumokat pull down kísérletben vizsgáltuk. Eredményeink alapján a merlin a FERM-doménjén keresztül kötődik a TIMAP fehérjéhez. Irodalmi adatokból ismert, hogy a merlinnel kölcsönható fehérjék többsége a fehérje FERM-doménjéhez kapcsolódik.

A TIMAP csendesítés hatásának vizsgálata a merlin és a PP1c-TIMAP kölcsönhatására illetve a merlin foszforilációjára

Munkacsoportunk tagja először megvizsgálta, hogy a TIMAP csendesítése miként befolyásolja a merlin és PP1c enzim kölcsönhatását. A TIMAP csendesítése specifikus siRNS-sel történt, kontrollként pedig nem-specifikus siRNS-sel kezelt minták lettek alkalmazva. A csendesítést követően merlin elleni antitesttel immunprecipitációs kísérlet lett végrehajtva, majd a teljes endotél sejtlyizátum és az immunprecipitátumok Western blot kísérletben lettek vizsgálva a TIMAP depletált minták és a nem-specifikus siRNS-sel kezelt minták esetében is. A fehérje csendesítése sikeresnek bizonyult, a TIMAP specifikus siRNS-sel kezelt sejtlyizátumban nem volt detektálható a fehérje. A nem-specifikus siRNS-sel kezelt minták immunprecipitátumában specifikus antitestekkel detektálható volt a merlin, a TIMAP, a PP1c, valamint a MYPT1 jelenléte egyaránt. A TIMAP depletált minták immunprecipitátumában azonban nem volt kimutatható a PP1c. Mindezek mellett nem volt detektálható a MYPT1 fehérje sem a merlin immunprecipitátumában függetlenül a TIMAP jelenlététől, vagy hiányától. Ezen eredmények azt sugallják, hogy egyrészt a merlin és a PP1c közötti kölcsönhatás nem közvetlen, hanem az interakció a TIMAP fehérjén keresztül valósul meg, másrészt, hogy a TIMAP-nak szerepe lehet a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjának szabályozásában. A kísérlet további részében munkacsoportunk arra a kérdésre kereste a választ, hogy a TIMAP fehérje csendesítése miként befolyásolja a merlin Ser518 oldalláncon történő defoszforilációját. BPAE sejtek immunfluoreszcens festését követően az volt tapasztalható, hogy foszfo-Ser518-merlin szintje megemelkedett az endotél sejtek plazmamembránjában a kontroll, nem-specifikus siRNS-sel kezelt sejtekhez képest, amely eredmény tovább erősített azt a feltételezést, hogy a merlin Ser518 oldalláncon történő defoszforilációjának szabályozásában a TIMAP fehérje érintett lehet.

A PP1c enzim gátlása növeli a merlin Ser518 oldalláncon történő foszforilációját endotél sejtekben

Miután a korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex kötődik a merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formájához, illetve azt tapasztaltuk, hogy a TIMAP csendesítése hatással van a foszfo-Ser518-merlin membránbeli feldúsulásában, bizonyítani akartuk, hogy a PP1 enzim játszhat szerepet a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában. Ehhez, BPAE sejteket tautomycin-nel, mint specifikus PP1 enzim gátló szerrel, okadánsavval, mint specifikus PP2A enzim gátló szerrel és ciklosporin A-val, mint specifikus PP2B enzim gátló szerrel kezeltünk. Ezután a sejteket felkapartuk, majd a kontroll sejtlyizátumot (vehikulum), illetve a specifikus gátlószerekkel kezelt teljes sejtlyizátumokat 1xSDS mintapufferben főztük, és Western blottal vizsgáltuk specifikus foszfo-Ser518-merlin, merlin és aktin elleni antitestek felhasználásával. A Western blottal nyert sávokat denzitometráltuk, majd a foszfo-Ser518-merlinre kapott jelet a merlin fehérjére normalizáltuk. A merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formája a specifikus PP1 gátlószer, a tautomycin hatására körülbelül kétszeresére emelkedett a kontroll, okadánsavval, vagy ciklosporin A-val kezelt mintákhoz képest. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PP1 enzim gátlásának hatására a foszfo-Ser518-merlin szintje szignifikánsan ($p < 0,001$) megemelkedett, ami arra enged következtetni, hogy a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjának szabályozásában a PP1 enzim játszik szerepet.

MEGBESZÉLÉS

A disszertációban bemutatott két új TIMAP kölcsönható partner, az eEF1A1 és a merlin megismerésével tovább bővültek ismereteink az endotél sejtekben magas szinten expresszálandó, PP1c regulátor alegység, TIMAP fehérjéről. Eredményeink alapkutatásból születtek, ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a foszfatázok működésének szabályozása ma már több betegség gyógyításában is használatos. Az endotél sejtek barrier funkciójának molekuláris ismerete pedig nélkülözhetetlen számos betegség kezelésében/gyógyításában. Az endotél sejtek gát funkciója számos jelátviteli útvonaltól függ, melyekben jelentős szerephez jut a fehérjék reverzibilis foszforilációja. A PP1c-TIMAP komplexnek több kölcsönható partnerét is azonosították a közelmúltban, melyek ismerete egyre több információt szolgáltat a holoenzim endotéliumban betöltött funkcióiról.

Egyik, újonnan azonosított kölcsönható partner az általunk leírt eEF1A1 fehérje. A fehérje azonosítását tömegspektrometriás analízissel végeztük, majd pull down és immunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk kölcsönhatását a PP1c-TIMAP komplex-szel. Az eEF1A1 elsődleges élettani funkciója a transzláció elongációs lépéséhez köthető. Emellett az irodalomban a fehérjének több egyéb, úgynevezett „moonlighting” funkcióját írták le. A nukleáris exportban betöltött szerepét a VHL és a PABP1 fehérjék kapcsán detektálták. A fehérjének ez a sejtelettani funkciója különösképp érdekesnek bizonyult számunkra, mivel a TIMAP fehérjét endotél sejtekben a plazmamembrán mellett a sejtmagban, és a mag körüli régióban is detektáltuk, de sem a sejtmagi szerepéről, sem pedig az onnan történő exportjáról nincsenek információink. Így megvizsgáltuk, hogy a TIMAP nukleáris exportjában az eEF1A1 fehérje részt vesz-e, amit többféle kísérleti metodikával is megpróbáltunk igazolni. *In vitro* pull down módszerrel kimutattuk, hogy az eEF1A1 fehérje a TIMAP csak azon régiójához kötődik, ami tartalmazza a fehérje 4-es és 5-ös ankirin ismétlődését. Az eEF1A1 sejtmagi exportban betöltött szerepe kapcsán feltárták, hogy az interakció létrejöttében szükséges a kölcsönható fehérjék szekvenciájában az úgynevezett transzkripció-függő nukleáris export motívum (TD-NEM, **DxGxxDxxL**) megléte. A TIMAP szekvenciájának gondos elemzését követően megállapítottuk, hogy a TIMAP, eEF1A1 fehérje kölcsönható régiójaként feltárt szekvenciában van egy rövid szakasz, ami a TIMAP TD-NEM szerű motívumának felelhet meg (₂₅₀**DHGVRVDVKDW**₂₆₀). A TD-NEM motívum három konzervált aminosavat tartalmaz (félkövérrel vannak jelölve a szekvenciában). Az eEF1A1 által mediált nukleáris exportban esszenciális szereppel bíró TD-NEM motívumot leíró munkacsoport eredményei alapján az

eEF1A1 és a kölcsönható partnerei közötti kölcsönhatásban a második konzervált aminosavnak (G) kitüntetett szerepe van. Bemutatták, hogy a glicin alaninra történő változtatása drámaian lecsökkentette az eEF1A1 és a VHL, valamint PABP1 fehérjék kölcsönhatását. Ezért kísérleteink során létrehoztunk két olyan rövidített TIMAP fehérjét, amelyek egyikében a vad típusú, glicint kódoló TD-NEM szerű motívum szerepelt, míg a másik, mutáns konstrukt a glicin helyett alanint kódoló szekvenciát tartalmazott. Eredményeink egybehangzóak voltak az irodalmi eredményekkel, a TIMAP TD-NEM szerű motívumában létrehozott aminosav csere megakadályozta az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatást, bizonyítva, hogy a VHL és PABP1 fehérjéken túl a TIMAP esetében is esszenciális a TD-NEM szerű motívum az interakció kialakításában.

A munka további részében munkacsoportunk tagjai immunfluoreszcens festéssel és szubcelluláris frakcionálással megvizsgálták az eEF1A1 szerepét a TIMAP nukleáris exportjában. Elsőként rövidített TIMAP 1-257 vad típusú és 1-257 G252A mutáns plazmidot BPAE sejtekbe transzfektáltak, és azt tapasztalták, hogy a mutáns fehérje nagymértékben a sejtmagban lokalizálódott a vad típusú fehérjéhez képest. Az eEF1A1 fehérje csendesítését követően azonban a TIMAP fehérje detektálható volt mind a sejtek citoplazmájában és plazmamembránjában egyaránt. Így tehát a kísérleti eredmények nem voltak meggyőzőek a tekintetben, hogy az eEF1A1 fehérjének kizárólagos szerepe lenne a TIMAP sejtmagi exportjában. Az eredmények azt sugallják, hogy bár a TD-NEM motívum valóban elengedhetetlen a TIMAP és az eEF1A1 fehérje kölcsönhatásában, mégis a TIMAP nukleáris exportjában nem az eEF1A1, vagy nem kizárólag vesz részt, így a TIMAP sejtmagi exportjában szereppel bíró fehérjék feltérképezése további kísérletes munkát igényel.

A TIMAP-ot szerkezete alapján a MYPT fehérjecsaládba sorolják. A fehérjecsaládra jellemző ankirin ismétlődések lehetővé teszik, hogy a család tagjai kölcsönhatásba lépjenek különböző fehérjékkel. Mivel a TIMAP TD-NEM szerű motívuma a fehérje egyik ankirin ismétlődésén található, felmerült a kérdés, hogy a TD-NEM motívum megtalálható-e a MYPT fehérjecsalád többi tagjában is. A MYPT család tagjainak aminosav szekvencia összehasonlítását követően az a konklúzió vonható le, hogy a család többi tagjában nem találhatóak meg a TD-NEM motívumra jellemző konzerválódott aminosavak. (TD-NEM motívum: ²⁵⁰**DHGV****RVDV****KD****W**₂₆₀, vastag: TD-NEM konzervált aminosav, aláhúzott: a MYPT fehérjecsaládban konzerválódott aminosav). Ez alapján feltételezhető, hogy a MYPT család tagjai közül a TIMAP kizárólagos kölcsönható partnere az eEF1A1 fehérjének.

Bár az eEF1A1 fehérje TIMAP sejtmagi exportjában betöltött szerepét nem sikerült egyértelműen bizonyítanunk, ugyanakkor kizárni sem tudjuk annak a lehetőségét, hogy az

eEF1A1 részt vesz ebben a folyamatban. A TIMAP a sejtmagból exportálódva a citoplazmában prenilálódik, majd a plazmamembránba transzlokálódik, ahol kiemelt szerepet tölt be az endotél sejtek barrier fenntartásában.

A sejtmagi exporton betöltött – egyelőre nem egyértelmű – funkció mellett az eEF1A1 endotél sejtekben betöltött szerepének további vizsgálatai során a munkacsoportunk eredményei arra utalnak, hogy az eEF1A1 a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja, és az eEF1A1 Thr oldalláncon történő defoszforilációját követően a plazmamembránba lokalizálódik, ahol és elősegíti az endotél sejtek szétterjedését és letapadását. (Ezeket az eredményeket a tézisfüzetben nem mutattam be.)

Az eEF1A1 mellett az ERM és az ECE-1 fehérjéket is munkacsoportunk azonosította korábban, mint a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátjait. A PP1c-TIMAP elengedhetetlen a sejtek endotelin-1 termelésének szabályozásában azáltal, hogy befolyásolja a PKC által foszforilált ECE-1 defoszforilációját. Az ERM fehérjék defoszforilációján keresztül pedig a komplex szabályozni képes az EC barrier funkciót. Az ERM-eket a Band 4.1 fehérjecsaládba sorolják a merlinnel együtt. A két fehérje között nagyfokú szekvencia homológia figyelhető meg, mely elsősorban a FERM domén első 300 aminosavát érinti. A TIMAP és a moezin kölcsönhatása, illetve a PP1c-TIMAP holoenzim ERM defoszforilációjában betöltött szerepe felvetette a kérdést, hogy a merlin kölcsönható partnere-e a PP1c-TIMAP holoenzimnek. A merlin a sejtekben tumorsuppresszorként funkcionál, és részt vesz a sejtproliferáció szabályozásában. A fehérjének 10 izoformája ismert, de leginkább az 1-es és a 2-es izoforma kutatott és jellemzett. Eredményeink alapján elmondható, hogy endotél sejtekben mindkét izoforma kifejeződik. A teljes hosszúságú vad típusú 1-es merlin izoformát kódoló DNS-t a későbbi kísérletekhez bakteriális vektorba szubklónoztuk. Azért az 1-es izoformát választottuk, mivel a merlin 2-es izoformája tartalmaz egy plusz exont (16-os exon) az 1-es izoformához képest, ez az exon azonban stop kodonnal végződik, mely egyrészt egy rövidebb átíródott terméket eredményez, másrészt nem kódolja a C-terminális domént, aminek az intramolekuláris kölcsönhatások kialakításában van esszenciális szerepe. Ezt követően a PP1c-TIMAP komplex és a merlin kölcsönhatásának kimutatására pull down és immunprecipitációs kísérleteket végeztünk, és a minták Western blot analízisével igazoltuk, hogy a merlin és a TIMAP kölcsönhatnak egymással BPAE sejtekben. Rövidített TIMAP fehérjéket pull down kísérletben felhasználva megállapítottuk, hogy a TIMAP rendezett fehérjeszerkezetet mutató N-terminális felével (1-290 aminosav) – ami tartalmazza a nukleáris lokalizációs szignált, a PP1c kötő motívumot és az öt ankirin ismétlődést – kötődik a merlinhez, míg a TIMAP kevésbé rendezett C-terminális fele (291-567 aminosav) nem tudott kötődni a fehérjéhez, hasonlóan az ERM-

ekhez. A merlin kölcsönható partnereiről és a kölcsönhatások természetéről viszonylag sok információ áll a rendelkezésünkre, köszönhetően annak, hogy a merlin fehérjét mintegy húsz éve kutatják. Ismert, hogy a large tumor suppressor kináz 1 és 2 (Lats 1/2) a merlin FERM doménjén keresztül kapcsolódik a fehérjéhez, és a kölcsönhatás fizikailag blokkolja a merlin FERM és C-terminális doménjén keresztül megvalósuló auto-inhibícióját. Egy másik publikáció arról számol be, hogy a merlin tubulinhoz való kötődése a FERM doménen, illetve a C-terminális doménen keresztül jön létre Schwann sejtekben. Saját kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex kötésében a merlin FERM doménje a felelős, hasonlóan, ahhoz, ahogy az az irodalomban korábban merlin kölcsönható partnerként azonosított legtöbb fehérje esetében teljesül. Jól ismert tény, hogy a merlin Ser518 oldalláncon történő foszforilációja hatással van a fehérje biológiai aktivitására, intra-, és intermolekuláris kölcsönhatásaira, továbbá sejten belüli lokalizációjára. A foszforilálatlan merlin tumorszuppresszor funkciót lát el a sejtekben, míg a Ser518 oldalláncon foszforilált forma a tumorszuppresszor funkció szempontjából inaktív. Kísérleteink során immunprecipitációs kísérletben sikeresen kimutattuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásba lép a merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formájával is. A munkánk további részében azt vizsgáltuk, hogy a merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának fiziológiai hátterében szerepet játszik-e a foszfo-Ser518-merlin PP1c-TIMAP általi defoszforilációja. Számos, az irodalomból ismert eredmény tükrében logikus feltételezésnek tűnt, hogy endotél sejtekben a PP1c-TIMAP komplex lássa el ezt a funkciót. Ismert, hogy egyes sejttypusokban a MYPT fehérjecsald más tagja szolgál a PP1c regulátor alegységeként, míg endotél sejtekben a TIMAP tölti be ezt a funkciót. Például, Fukata és munkatársai az MYPT1 fehérjét jelölik meg MDCK epitél sejtekben, mint a moezin defoszforilációját végző PP1c regulátor alegységet, ugyanakkor endotél sejtekben ezt a funkciót a TIMAP látja el. Emelett pankreas karcinoma, melanoma, ovárium adenokarcinóma, májtumor, tüdő, illetve emlő karcinoma sejt vonalakon vizsgálódva azt találták, hogy a merlin defoszforilációját a PP1c-MYPT1 komplex végzi. Annak igazolására, hogy endotél sejtekben valóban a TIMAP szerepel, mint a PP1c regulátor alegysége, munkacsoportunk elvégezte a TIMAP csendesítését. A sejt lizátumok Western blot analízise azt az eredményt hozta, hogy TIMAP depletált sejtekben a PP1c nem kötődött a merlinhez. Az immunprecipitátumokban a MYPT1 jelenlétét vizsgálva kiderült, hogy a merlin nem lépett kölcsönhatásba a MYPT1-gyel sem a TIMAP csendesített, sem a kontroll, nem-specifikus siRNS-sel kezelt sejtekben. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a TIMAP irányítja a PP1c enzim katalitikus alegységét a merlinhez. További vizsgálatok alapján elmondható, hogy a TIMAP csendesítése hatással van a foszfo-Ser518-merlin lokalizációjára

és a foszforilált fehérje szintjének emelkedésére. A kísérletek azt az eredményt hozták, hogy TIMAP hiányában a foszfo-Ser518-merlin szintje megemelkedett és a plazmamembránban dúsult. Ez az eredmény ismételt a PP1c-TIMAP komplex foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában való részvételét sugallja.

Végül, megvizsgáltuk, hogy a PP1 enzimén kívül más foszfatáz szereppel bírhat-e a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában. A merlin Ser518 oldalláncon történő defoszforilációjáról kevés adat áll rendelkezésünkre, endotél sejtekben pedig ezidáig egyáltalán nem vizsgálták a jelenséget. BPAE sejteket különböző foszfatáz gátlókkal kezeltünk. A tautomycin egy természetes eredetű toxin, mely koncentrációfüggő módon szelektív gátlószere a PP1 enzimnek. A tautomycin mellett az okadánsavról közismert, hogy megfelelő koncentrációban alkalmazva specifikus PP2A, míg a ciklosporin A-ról, hogy specifikus PP2B gátló toxin. A foszfatázgátlók kezelését követően Western blot analízist végeztünk, és azt tapasztaltuk, hogy a specifikus PP1 gátlószer tautomycin hatására szignifikánsan megemelkedett a foszfo-Ser518-merlin szintje, míg a másik két gátlószer hatására nem történt változás. Ez azt igazolja, hogy endotél sejtekben a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjáért közvetlenül, vagy közvetve a PP1 enzim felel.

A merlin endotél sejtekben betöltött szerepét tovább vizsgálva munkacsoportunk tagjai azt találták – az irodalmi adatokkal összhangban –, hogy a merlin defoszforilált formában gátolja az endotél sejtek proliferációját, míg a Ser518 oldalláncon foszforilált formája ezzel ellentétes hatással bír. (Ezt az eredményt a tézisfüzetben nem mutattam be.)

Az értekezésben ismertetett két új PP1c-TIMAP szubsztráttal újabb fehérjék nevét írhatjuk fel a komplex szubsztrátjait összegyűjtő listára. Ezeknek a fehérjéknek, és a holoenzimmel való kölcsönhatásuknak a megismerésével egyre több ismeretet nyerhetünk az endotél sejtekről, melyek optimális működése elengedhetetlen szerveink megfelelő működésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az endotél sejtek barrier funkciója fontos szerepet tölt be a szervek megfelelő működésében, melyben központi szerepet játszik az endotél sejtek citoskeletonjának és az ehhez kapcsolódó fehérjéknek a foszforiláltsági szintje. A TIMAP (TGF β -gátolt membrán asszociált fehérje) a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységének (PP1c) regulátor alegységeként azonosított fehérje, melynek expressziós szintje endotél sejtekben nagyon magas más sejttípusokhoz képest. Több kölcsönható partnere ismert, melyekkel együtt a TIMAP fehérjének fontos szerepe van a barrier funkció fenntartásában.

Munkánk során sikeresen azonosítottuk az eukarióta elongációs faktor 1 A 1 (eEF1A1) fehérjét, mint új TIMAP kölcsönható partnert. Igazoltuk, hogy a két fehérje kölcsönhatásában fontos szerepet kap egy, a TIMAP szekvenciájában fellelhető rövid peptid szakasz, melyet transzkripció-függő nukleáris export motívumnak (TD-NEM) neveznek. A TD-NEM megléte esszenciális a két fehérje kölcsönhatásában, a motívum második konzervált aminosavának glicinről alaninra történő cseréje negatív hatással volt az eEF1A1-TIMAP interakcióra. A mutáns rövidített TIMAP fehérje döntően a sejtmagban lokalizálódott, ugyanakkor az eEF1A1 csendesítése nem volt hatással a TIMAP sejtmagi exportjára.

Ezen kívül igazoltuk, hogy a PP1c-TIMAP kölcsönható partnere a tumorsuppresszor merlin (moezin-ezrin-radixin like protein) fehérjének. Kimutattuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex a merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formájával is kölcsönhatásba lép, mely oldallánc foszforiláltsága/defoszforiláltsága kulcsszerephez jut a fehérje tumorsuppresszor funkciójában. Feltérképeztük a két fehérje közötti kölcsönhatást, amikor is azt találtuk, hogy a TIMAP N-terminális felével, míg a merlin a FERM-doménjén keresztül vesz részt a kölcsönhatásban. A TIMAP csendesítését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a TIMAP fehérje hiányában a merlin nem tudott kötődni a PP1c enzimhez. A merlin és a MYPT1 kölcsönhatását sem a TIMAP fehérje jelenlétében, sem hiányában nem tudtuk detektálni. Immunfluoreszcens festést követően kimutattuk, hogy a foszfo-Ser518-merlin szintje megemelkedett a sejtek plazmamembránjában. Specifikus foszfatázgátlók alkalmazását követően arra az eredményre jutottunk, hogy a specifikus PP1 gátló tautomycin hatására szignifikánsan megemelkedett a foszfo-Ser518-merlin szintje, ami a PP1c-TIMAP komplex szerepét igazolja a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjának szabályozásában.

Az itt leírt két új TIMAP kölcsönható partner azonosításával tovább bővültek ismereteink a TIMAP endotél sejtekben betöltött – láthatóan – sokszínű funkcióiról.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az eEF1A1 a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben.
2. A kölcsönhatás a TIMAP 165-290 aminosav (4-es és 5-ös ankirin ismétlődés) régióján keresztül valósul meg.
3. A kölcsönhatás kialakításában esszenciális a TIMAP TD-NEM szerű motívuma.
4. Endotél sejtekben kifejeződik a merlin 1-es és 2-es izoformája egyaránt.
5. A merlin fehérje a PP1c-TIMAP komplex kölcsönható partnere endotél sejtekben.
6. A kölcsönhatás a TIMAP oldaláról a fehérje N-terminális „felén”, a merlin oldaláról a FERM-doménon keresztül valósul meg.
7. A PP1c-TIMAP komplex érintett a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjának szabályozásában.

KULCSSZAVAK

endotél sejtek, reverzibilis fehérje foszforiláció, PP1, TIMAP, eEF1A1, merlin, foszfo-Ser518-merlin, pull down, immunprecipitáció

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/315/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Péter Margit
Neptun kód: L9OFUB
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10051740

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

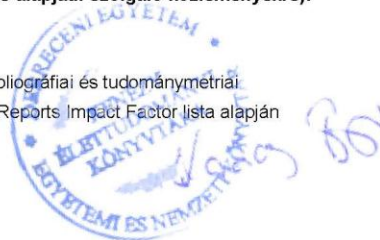
1. Boratkó, A., **Péter, M.**, Csontos, C.: Regulation of merlin by protein phosphatase 1-TIMAP and EBP50 in endothelial cells.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 82, 10-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.11.010>
**Anita Boratkó and Margit Péter contributed equally to this work.*
IF: 3.905 (2015)
2. Boratkó, A., **Péter, M.**, Thalwieser, Z., Kovács, E., Csontos, C.: Elongation factor-1A1 is a novel substrate of the protein phosphatase 1-TIMAP complex.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 69, 105-113, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.021>
IF: 3.905

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,81

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,81

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

Debrecen, 2016. 11. 29.



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. □ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: www.lib.unideb.hu

KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

Konferencia előadások

Péter Margit, Boratkó Anita, Csontos Csilla: Investigation of interaction between TIMAP and merlin in endothelial cells.
Cell Biology and Signaling Conference (a training course).
Galyatető, 2016. május 20-22.

Péter Margit: Role of protein-protein interaction in endothelial cells
Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine
Debrecen, 2015. szeptember 1.

Péter Margit, Boratkó Anita, Csontos Csilla: EBP50 protein and its interacting partners in vascular endothelial cells
Cell Biology and Signaling Conference
Egerszalók, 2015. május 29-31.

Margit Péter: Protein-protein interactions in endothelial cells
Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine
Debrecen, 2014. szeptember 4.

Margit Péter, Boratkó Anita, Csontos Csilla: Investigation of a new interacting partner of TIMAP
Signaling pathways in cancer biology (a training course)
Mátraháza, 2014. május 16-18.

Konferencia poszterek

Anita Boratkó, **Margit Péter**, Csilla Csontos: Interaction of PP1c-TIMAP complex with merlin
Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society
Szeged, 2016. augusztus 28-31.

Péter Margit*, Boratkó Anita*, Csontos Csilla: A PP1c-TIMAP komplex szerepének vizsgálata a merlin^{Ser518} szabályozásában
*első szerzők
46. Membrán-Traszport Konferencia
Sümege, 2016. május 17-20.

A t zisz zlet létrejöttét a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 pályázat támogatta.