

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A miozin foszfatáz és a smoothelin-szerű 1 fehérje funkcióinak
vizsgálata**

Sipos Adrienn



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A miozin foszfatáz és a smoothelin-szerű 1 fehérje funkcióinak
vizsgálata**

Sipos Adrienn

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

A miozin foszfatáz és a smoothelin-szerű 1 fehérje funkcióinak vizsgálata

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

Írta: Sipos Adrienn okleveles biológus/biotechnológus

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

Témavezető: Dr. Lontay Beáta, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora
Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet 2.306 iroda
2015. június 24. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Mádi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Szentandrásy Norbert, PhD
Dr. Vas Virág, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2017. június 16. 14:00 óra

BEVEZETÉS

Az egyik legjelentősebb poszttranszlációs szabályozási mechanizmus a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, mely a fehérjék defoszforilációját katalizáló protein foszfatáz 1 (PP1) enzimesalád tagja. A MP egy katalitikus alegységből (PP1c δ), egy miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1) és egy eddig még ismeretlen funkciójú 20 kDa alegységből áll. A MYPT fehérjecsalád további tagjai a MYPT2, MYPT3, MBS85 és TIMAP regulátor fehérjék. A MYPT fehérjék biztosítják a PP1c δ katalitikus alegység szubsztrát-specifitását, és az enzimek célirányítását a sejten belül.

A MYPT fehérjék szerkezete

A MYPT fehérjék jelentős szekvencia-homológiát mutatnak és számos konzervált doménnel rendelkeznek. Az N-terminális végükön található RVxF motívum a katalitikus alegység jól konzervált központi részéhez kapcsolódva biztosítja annak kötődését. A PP1c δ -val való kapcsolat kialakítását további motívumok is segítik a MYPT fehérjék szerkezetében, mint pl. a 10-17 oldallánc közötti szakasz, az úgynevezett MyPhoNe (myosin phosphatase N-terminal element) motívum, mely egy konszenzus RxxQV/I/LK/RxY/W szekvencia. Az RVxF motívumot nyolc vagy kevesebb ankirin ismétlődés követi, melyek közül az 1, 5, 6 és 7-edik a PP1c δ C-terminális szakaszához kapcsolódik a katalitikus alegységhez való kötődés során. Az ankirin ismétlődéseken keresztül valósul meg a legtöbb szubsztrát MYPT fehérjékhez való asszociációja. Emellett jól konzervált foszforilációs helyekkel is rendelkeznek a fehérjecsalád tagjai, melyek közül a Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³ oldalláncok egyaránt megtalálhatóak a MYPT1 és MYPT2 fehérjékben, míg az MBS85 fehérje csak a Thr⁶⁹⁶ oldalláncot, a család többi tagja (MYPT3, TIMAP) pedig egyik foszforilációs helyet sem tartalmazza. A MYPT1, MYPT2 és MBS85 fehérjék C-terminális részén található leucin cipzár motívumok a fehérje-fehérje kölcsönhatások és dimerizációs folyamatok kialakításában vesznek részt. A MYPT3 és TIMAP fehérjék nem tartalmaznak leucin cipzár motívumot. Mindezekon felül a MYPT1 két nukleáris lokalizációs szignállal (NLS) is rendelkezik.

A miozin foszfatáz szerepe a citoskeletális folyamatokban

A miozin II foszforiláció általi szabályozása elengedhetetlen az izomkontrakció és más, nem-izom sejtekben is lejátszóó folyamatok során, mint a sejtek alakváltoztatása, sejtosztódás és citokinézis, a sejtek adhéziója, migrációja illetve az ionszatórnák szabályozása. A 20 kDa könnyű lánc (MLC20) foszforilációját követően a miozin II kötődik az aktinhoz, és az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja, míg a miozin foszfatáz által történő defoszforiláció elernyedést eredményez. Az MLC20 foszforiláltsági szintjét a Ca²⁺/kalmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz (MLCK) és a

MP aktivitása közötti egyensúly határozza meg. Állandó intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett is történhet izomkontrakció, még hozzá agonisták hatására. Ca^{2+} -szenzitizáció során a MYPT1 Thr⁶⁹⁶ ROK általi foszforilációja csökkenti a miozin foszfatáz aktivitását, mely az MLC20 emelkedett foszforilációja révén a citoskeletális elemek összehúzódsát váltja ki. Ezzel szemben Ca^{2+} -deszenzitizáció során a MP aktiválása történik ciklikus nukleotid-függő kinázok (PKA/PKG) által, melyek a MYPT1 Ser⁶⁹⁵ oldallancát foszforilálva megelőzik a MYPT1 gátló helyeinek foszforilációját, aktív állapotban tartva ezzel a miozin foszfatázt.

A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter kibocsátásban

Az idegsejtek élettani folyamataiban az idegi fehérjék szabályozásának egyik legfontosabb módja a fehérjék reverzibilis foszforilációja. Számos protein kináz szerepe jól definiált az idegi szabályozás során, azonban keveset lehet tudni a reverzibilitásért felelős foszfatázok kapcsán. A MYPT1 jelenlétét sikeresen kimutatták patkány agyban és primer idegsejt kultúrákban egyaránt. Agykérgi szinaptoszóma preparátumokban jelentős miozin foszfatáz aktivitást tapasztaltak, és a holoenzim tagjai kolokalizációt mutattak a szinaptofizinnel, mely egy preszinaptikus marker. Specifikus PP1 inhibitorokat alkalmazva szinaptoszóma preparátumokon, a neurotranszmitter kibocsátás gátlását tapasztalták, míg a ROK gátlásával annak jelentős növekedését. A szintaxin-I Ser¹⁴ oldallancának és a szinapszin-I Ser⁹ oldallancának ROK- és MP-függő foszforilációját is bizonyították, mely a ROK és miozin foszfatáz enzimpár neurotranszmitter kibocsátásban betöltött jelentőségére utal.

A miozin foszfatáz szerepe a sejtproliferáció során

A sejtmagban található retinoblasztóma fehérje (pRb) a tumorsuppresszor retinoblasztóma gén terméke, és a sejthalál szabályozásában központi szerepet játszik. Gátolja a sejtproliferációt, funkciójának kiesése daganatok kialakulását eredményezi. Leukémiás sejtekben a pRb alacsony expresszióját és hiperfoszforilált állapotát mutatták ki, amely a daganatos sejtek osztódását serkentette. THP-1 leukémiás sejtekben a MYPT1 és a pRb kolokalizációt mutatott, és a MYPT1 hiánya esetén a retinoblasztóma fehérje foszforilációs állapota illetve a THP-1 sejtek túlélési képessége megemelkedett, mely a miozin foszfatáz kulcsfontosságú szerepére utal a leukémiás sejtek sejtciklusának szabályozásában a pRb defoszforilációja által.

A citoskeletális merlin fehérje elsősorban scaffold fehérjeként funkcionál az aktin hálózat és a sejtmembrán vagy membrán-asszociált glikoproteinek között. A merlin a citoplazma mellett a sejtmagban is előfordul és tumorsuppresszor funkciót lát el. A C-terminális Ser⁵¹⁸ oldalláncon történő PAK és PKA enzimek általi foszforilációja következtében tumorsuppresszor funkcióját nem képes ellátni. A miozin foszfatáz aktiváló hatással bír a merlin fehérjére, annak foszfo-Ser⁵¹⁸ oldallancának defoszforilálása révén.

A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 foszforilációján keresztül

A miozin foszfatáz szabályozásának egyik lehetséges módja a MYPT1 Ser és/vagy Thr oldalláncokon történő foszforilációja, mely az enzim aktiválását és gátlását is eredményezheti. Számos foszforilációs helyet azonosítottak eddig a MYPT1 szekvenciáján belül, melyek közül a Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³ oldallánc a két leginkább tanulmányozott foszforilációs hely. A Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³ oldalláncok foszforilációja a RhoA aktivált protein kináz (ROK) által a holoenzim gátlását eredményezi. A Thr⁶⁹⁶ foszforilációs helyet közvetlenül megelőző Ser⁶⁹⁵ oldallánc foszforilációja, melyet PKA/PKG enzimek katalizálnak, megakadályozza a Thr⁶⁹⁶ oldallánc foszforilációját, így csökkentve annak a holoenzimre gyakorolt gátló hatását. A ROK mellett számos egyéb kináz hat a miozin foszfatázra a MYPT1 Thr⁶⁹⁶ oldalláncán keresztül. Aktiváló foszforilációs szabályozásra példa a cdc2 kináz által mitózis során történő foszforiláció a Thr⁴³⁵ és/vagy Ser⁴³² oldalláncokon, mely megnöveli a miozin foszfatáz miozin iránti affinitását. Azonban a MYPT1 foszforilációja a Ser⁴⁴⁵, Ser⁴⁷² és Ser⁹¹⁰ oldalláncokon a foszfatáz gátlását, a miozin emelkedett foszforilációját és a sejtek tapadásának gyengülését eredményezik.

A miozin foszfatáz szabályozása kölcsönható fehérjék révén

Elsők között azonosították az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) kisméretű hőstabil fehérjéket, mint PP1-et gátló fehérjéket, melyek a szabad PP1c alegységhez kötődve csökkentik annak aktivitását. Amennyiben azonban a PP1c valamely szabályozó alegységgel komplexet alkot, ezen inhibitorok gátló hatása csökken vagy teljesen eltűnik. Ezzel szemben a CPI-17 fehérje nemcsak a PP1c katalitikus alegységet, hanem magát a MP holoenzimet is képes gátolni foszforiláció függő módon. A CPI-17 család másik tagja, a kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI) valamint a 32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszoprotein (DARP-32) szintén gátló hatással bírnak. A 14-3-3 β egy a citoskeletális átrendeződést elősegítő fehérje, ami a MYPT1-hez kapcsolódva csökkenti annak miozinhoz való kötődését és a MP komplex miozinról történő disszociációját eredményezi a miozin könnyű lánc fokozott foszforilációjához vezetve. A telokin, mely nem rendelkezik kináz aktivitással, fokozza a MP aktivitását anélkül, hogy megváltoztatná annak foszforilációját, valamint Ser¹³ oldalláncának PKA/PKG enzimek általi foszforilációja elengedhetetlen a MP-ra gyakorolt aktiváló hatásának kifejtéséhez. A Par-4 fehérje vaszkuláris simaizomban az aktin filamentumhoz kolokalizálódva kölcsönhatásba lép a MYPT1-el, és növeli a MP aktivitását. A közelmúltban azonosították a smoothelin-szerű 1 fehérjét (SMTNL1), mint a miozin foszfatázra gátló hatást gyakorló fehérjét, mely a simaizomra jellemző smoothelin fehérjecsalád tagja.

A smoothelin fehérjék és az SMTNL1 szerkezete és funkciója

A smoothelin-szerű 1 fehérje a simaizomra jellemző smoothelin (SMNT) fehérjecsalád tagja, melynek további tagjai a smoothelin A (SMTN-A) és smoothelin B (SMTN-B) fehérjék, valamint a smoothelin-szerű 2 fehérje, melyről még nagyon keveset tudunk. Az SMTN-A fehérje egy 59 kDa molekulatömegű rövid izoforma, mely a viscerális simaizmokban expresszálódik, míg a 100 kDa nagyságú hosszú izoforma, az SMTN-B az erek simaizomatára jellemző. Az SMTNL1 expressziója ezzel szemben nem korlátozódik a simaizomra, hanem megtalálható még vázizomrostokban és szteroid hormonokra érzékeny szövetekben is. Az SMTN fehérjecsalád tagjai nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak főként a C-terminális vég tekintetében, melyen egy 2-es típusú kalponin homológ (CH) doménnel rendelkeznek. Azonban míg az SMTN-A és -B fehérjék igen, addig az SMTNL1 nem képes kötődni az aktinhoz. Ennek oka feltehetően az aktin-kötő domén/ek hiánya, melyből az SMTN-B fehérjén kettő, míg az SMTN-A fehérjén egy található, illetve utóbbiak tartalmaznak még egy-egy tropomiozin-kötő motívumot is. Az SMTNL1 szintén képes kötődni a tropomiozinhoz, mely elősegíti a vékony filamentumokhoz való asszociációját a CH-doménon keresztül. Az SMTNL1 CH-doménjének N-terminális végén található IQ motívum (apo-CaM-kötő domén, CBD2) a fehérje ligandum nélküli kalmodulinnal (CaM) való kölcsönhatását teszi lehetővé, míg a Ca²⁺-kötött kalmodulinhoz elsősorban egy másik, az ún. Ca²⁺-CaM-kötő doménon keresztül (CBD1) kapcsolódik. Az SMTNL1 Ser³⁰¹ oldalláncát ciklikus nukleotid függő protein kinázok (PKA/PKG) foszforilálják, ami meghatározó jelentőséggel bír a fehérje funkciói során.

A kezdeti kutatások elsősorban az SMTNL1 kontrakcióban betöltött szerepét tárgyalták, habár az SMTNL1 expressziója szteroid hormonra érzékeny szövetekben is kimutatható, mint pl. az endometrium vagy myometrium. Ezen kívül az SMTNL1 mind *in vivo* mind *in vitro* kötődött a progeszteron receptorhoz (PR). Reprodukzív fenotípust tekintve az *smtnl1* hiányos egerekre csökkent temékenység és gyakoribb embrionális korban történő halálozás jellemző, valamint a terhességek között is hosszabb idő telik el. RNS interferencia segítségével kimutatták az SMTNL1 közvetlen hatását a PR szabályozásában és génexpressziós vizsgálatok alapján az SMTNL1 koregulátor szerepét állapították meg a PR transzkripció során. Terhesség alatt a Ser³⁰¹ oldalláncan történő foszforilációját követően az SMTNL1 a sejtmagba transzlokálódik, ahol kötődik a progeszteron receptor B izoformájához, és gátolja annak transzkripciós aktivitását.

CÉLKITŰZÉSEK

A miozin foszfatáz (MP) a citoskeletális folyamatokban és az izom összehúzóásban betöltött szerepét elsősorban a miozin II 20 kDa könnyű láncának defoszforilációján keresztül fejti ki, így szabályozva a kontraktilitást, a sejtmozgásokat és a migrációt izom és nem-izom sejteknel egyaránt. A MP széleskörű szabályozó szerepét mutatja, hogy a miozin II mellett számos egyéb szubsztrátja van illetve, hogy a MP szabályozó alegysége, a MYPT1 változatos sejten belüli lokalizációt mutat különböző sejtípusok esetén. Kimutatták, hogy a MYPT1 a citoplazmából a sejtmembránhoz és sejtmagba képes transzlokálódni, illetve jelentős miozin foszfatáz aktivitást mértek sejtmagi frakciókban, mely a MP sejtmagi folyamatokban betöltött szabályozó szerepére utal. Ezek alapján célkitűzéseim az alábbiak voltak:

- A MYPT1 sejttagon belüli pontos lokalizációjának és lehetséges sejtmagi kölcsönható partnereinek meghatározása humán hepatokarcinóma (HepG2) sejtekben.
- A miozin foszfatáz lehetséges sejtmagi szubsztrátjaira gyakorolt szabályozó szerepének vizsgálata.

Másrészről a MP egy már ismert regulátora a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1), mely terhesség és testedzés során szabályozza a megnövekedett teherre adott választ a MP aktivitásának szabályozásán keresztül. A két fehérje közötti kölcsönhatás molekuláris háttere azonban még tisztázatlan. Ezzel kapcsolatban az alábbiakat kívántam vizsgálni:

- A MYPT1 és az SMTNL1 fehérjék közötti feltételezhetően közvetlen kölcsönhatás tanulmányozása kötődési vizsgálatok segítségével és a kötődésben részt vevő régiók azonosítása a MYPT1 szekvenciájában.
- Az SMTNL1 fehérje terhességben betöltött szerepének vizsgálata a vázizomzat adaptációs folyamataiban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felületi plazmon rezonancia (SPR)

A PRMT5 és az SMTNL1 fehérjék MYPT1-el való kölcsönhatását felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérletekkel tanulmányoztuk Biacore 3000 készülék segítségével. CM5 szenzor chip felszínére anti-GST antitesten keresztül GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ fehérjéket kötöttünk ki, valamint His-MYPT1¹⁻⁶³³ fehérjét immobilizáltunk aminos csoporton keresztül. A kontroll kísérletekben rekombináns GST-t és 1M etanolammal blokkolt ligandmentes felületet alkalmaztunk. A fehérje-fehérje kölcsönhatások kinetikai paramétereinek meghatározására Flag-PRMT5 vagy -SMTNL1 fehérjéket injektáltunk a felszínre különböző töménységben. Az aspecifikus kötődést a kontroll felszínnek segítségével szűrtük ki. Az immobilizált MYPT1 fragmentumokhoz kötődött PRMT5 és SMTNL1 mennyiségét az idő függvényében ábrázoltuk, és az így nyert szenzorgramokat a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével elemezzé meghatároztuk a kötődésre jellemző asszociációs állandókat (K_a).

Sejtek tenyésztése és tranziens transzfekciója

A humán hepatokarcinóma (HepG2) és a humán embrionális vesesejteket (tsA201) DMEM sejtenyésztő oldatban növesztettük 2 mM L-glutamin és 10% hőinaktivált FBS tartalom mellett. A human emlő adenokarcinóma (MCF-7) sejteket 2 mM L-glutamin, 1% nem-esszenciális aminosav és 10% hőinaktivált FBS tartalmú MEM oldatban tenyésztettük. Mindhárom sejtvonal tenyésztése 37 °C-os inkubátorban történt 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében 60-90%-os konfluens kultúrákban.

A HepG2 és MCF-7 sejtek endogén MYPT1 fehérjeszintjének csökkentését duplaszálú siRNS felhasználásával végeztük szérumentes tenyésztőfolyadékban. A transzfekciós keverék 50 nM siRNS-t és megfelelő arányú Dharmafect 2 reagenst tartalmazott. 30 perces inkubáció után a médiumot hőinaktivált szérummal egészítettük ki, majd 48 órát követően felhasználtuk a sejteket.

TsA201 sejteket transzfektáltunk Flag-PRMT5^{wt}, Flag-PRMT5^{T80A} és Flag-MYPT1 szekvenciákat tartalmazó pReceiver-M11 plazmiddal szérumentes médiumban 1 mg/ml PEI transzfekciós reagens segítségével, a gyártó cég által megadott módon. 6 órás inkubációt követően a transzfekciós közeget eltávolítottuk és komplett DMEM médiumot adtunk a sejtekhez, majd további 24 óra elteltével felhasználtuk a transzfektált sejteket.

Sejtek frakcionálása

HepG2 és MCF-7 sejteket homogenizáltunk 400 µl A pufferben (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 % (v/v) Nonidet P-40, 0.5 mM PMSF, 1 x koncentrált proteáz inhibitor keverék). A homogenizálást 26G átmérőjű injekciós tűvel és 1 ml-es

fecskendő segítségével végeztük. A homogenizálás hatékonyságát tripánkék festék alkalmazásával fénymikroszkópban ellenőriztük. A lizátumokat 4°C-on 16,000 x g fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk, és a felülúszót citoplazma frakcióként használtuk tovább. A centrifugálásból származó pelletet mosási lépésként 200 µl A pufferben felfuszpendáltuk, és 26G tű segítségével homogenizáltuk az oldatot. Centrifugálási lépést követően a pellethez 100 µl B puffert adva (20 mM Hepes, pH 7.9, 420 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 x koncentrált proteáz inhibitor keverék) homogenizáltuk az oldatot, majd szonikáltuk és sejtmag frakcióként használtuk.

Egerek fenntartása és a szövetminták feldolgozása

A terhességi vizsgálatok során felhasznált kongenikus 129 SvEv *smtm11*^{-/-} egereket a Haystead laborban, az észak-karolinai Duke Egyetemen állították elő és tartották fenn. A vizsgálatokhoz 8 hetes egerek a terhesség 14-17. napján kerültek feldolgozásra. Az állatkísérleteket a Duke Egyetem Intézményi Állat- és Gyógyászati Bizottsága hagyta jóvá. A biopsziából származó humán vázizom minták felhasználását az Észak-Karolinai Egyetemhez tartozó Egyetemi és Orvosi Központ Intézményi Testülete engedélyezte. Az immunoblot kísérletekhez az egerből származó plantaris izommintákat folyékony N₂-ben fagyasztottuk és jégen, dounce homogenizátor segítségével 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% (m/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 20 mM DTT, 127 mM 2-merkaptoetanol összetételű, proteáz és foszfátáz inhibitor is tartalmazó pufferben dolgoztuk fel. 20 perces jégen állást követően a szövet lizátumokat 13,000 x g fordulatszámmal 4°C-on 5 perc alatt lecentrifugáltuk, majd a felülúszót 100°C-on 5x fehérje minta pufferrel kiegészítve felfőztük. A lizátumok fehérjetartalmát BCA eljárással határoztuk meg.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A HepG2 sejteket kollagénnel borított fedőlemezekre tenyésztettük, majd mosást követően etanollal fixáltuk és 0.5% Triton-X-100 oldattal 3 percig szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. TBS-el történő mosást követően 1% BSA oldattal 60 percig 4°C-on inkubálva blokkoltuk a sejteket. Az elsődleges antitesteket 1:100, a másodlagos antitesteket 1:200 hígításban alkalmaztuk 4°C-on legalább 60 percig, majd a sejtmagok megjelölését To-Pro-3 jodid (1:1000) vagy DAPI (1:2000) festékkel végeztük. Mosást követően ProLong Gold Antifade reagens segítségével tárgylemezre borítottuk a már megfestett mintákat és Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A konfokális felvételeket a mikroszkóp saját programjával és a PhotoShop programmal elemeztük.

Pull-down kísérletek

A MYPT1-el kölcsönható sejtmagi fehérjék meghatározásához Flag-MYPT1 fehérjét kötöttünk anti-Flag M2 affinitás gélhez, míg a kontroll kísérletekben Flag-peptidet alkalmaztunk. A

pull down kísérletek során már előtisztított HepG2 sejtmagi frakciót adtunk Flag-MYPT1 –et vagy Flag-peptidet tartalmazó gyöngyökhöz, és 2 órán át folyamatos kevertetés mellett együtt inkubáltuk őket. A Flag-MYPT1-et a hozzá kötődött fehérjékkel együtt 300 µg/ml Flag-peptid segítségével leluáltuk a gyöngyökről, majd SDS-gélelektroforézist követően MS kompatibilis ezüst-festéssel tettük láthatóvá a fehérjesávokat. A kivágott sávok fehérjetartalmát LC-MS/MS tömegspektrometriás analízissel azonosítottuk.

Az *in vitro* kináz és foszfatáz, illetve protein arginin metiltransferáz kísérletekhez tsA201 sejteket transzfektáltunk Flag-PRMT5^{wt}, -PRMT5^{T80A} és Flag-MYPT1 plazmidokkal, majd a termeltetett fehérjéket anti-Flag M2 affinitás gél segítségével választottuk el a Flag toldalék segítségével. A Flag-PRMT5^{wt}, -PRMT5^{T80A} fehérjéket a gyöngyökhöz kikötve használtuk fel, míg a Flag-MYPT1-et 300 µg/ml Flag-peptid segítségével eluáltuk a gyöngyökről, és oldatban adtuk hozzá a foszfatáz és protein arginin metiltransferáz kísérleti elegyekhez.

***In vitro* protein kináz és foszfatáz kísérletek**

Az immunoblot elemzésekhez anti-Flag gyöngyökhöz rögzített Flag-PRMT5^{wt} és -PRMT5^{T80A} fehérjéket foszforiláltunk nem-radioaktív módon 0.5 mM ATP, 5mM MgCl₂ jelenlétében ROK (0.4 U/ml) segítségével, valamint 10 µM H1152 ROK inhibitor hozzáadásával vagy nélküle. A kináz reakció 30°C-on 30 percig zajlott, majd a gyöngyök mosását követően elindítottuk a foszfatáz kísérleteket. A ROK által foszforilált rekombináns PRMT5 fehérjék defoszforilálására 25 nM Flag-MYPT1 vagy 5 nM rPP1c_δ oldatot, illetve a kettő keverékét alkalmaztuk 30°C-on 15 percig, majd TBS-el való mosást követően 1 x SDS mintapuffer jelenlétében lefőztük a fehérjéket a gyöngyökről, és SDS-gélelektroforézissel elválasztottuk azokat. A PRMT5 Thr⁸⁰ foszforilációs szintjét foszfo-PRMT5^{T80} specifikus antitesttel, Western blot analízissel határoztuk meg, és a teljes PRMT5 mennyiséghez viszonyítottuk.

A Flag-MYPT1-hez kötődő fehérjék és a PRMT5 foszforilált oldalláncának azonosítása LC-MS/MS analízissel

Az SDS-gélből kivágott fehérjesávokat gélben történő tripszines emésztésnek vetették alá 37°C-on 4 órán át. A MYPT1 kölcsönható fehérjék azonosítására a kapott peptidkeverékeket közvetlenül az adatfüggő "triple play" LC-MS/MS-sel elemezték 3D-ion csapda tömegspektrométer alkalmazásával (LCQ-Fleet). A foszforilációs vizsgálatokhoz a peptidkeverékek körülbelül 80% -át foszfopeptid-dúsításnak vetették alá TiO₂ alkalmazásával, és a foszfopeptid frakciókat, valamint az eredeti minták fennmaradó 20%-át adatfüggő LC-MS/MS-sel elemezték egy Orbitrap Elite tömegspektrométer segítségével. A PAVA szoftver (v2010/szeptember) MS/MS adatain alapuló csúcslistákat a ProteinProspector keresőprogram segítségével, a Swissprot adatbázis (letöltve:

2013/06/27) felhasználásával azonosították. A proteomikai analízist a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Proteomikai Laboratóriumában végezték.

***In vitro* protein arginin metiltransferáz kísérlet**

A ROK által foszforilált, anti-Flag gyöngyökhöz kikötött Flag-PRMT5^{wt} fehérjék felhasználásával metiltransferáz kísérleteket végeztünk 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4 összetételű pufferben. 2 μ M S-adenozil-L-metionint (SAM) és 0.02 mg/ml hiszton fehérjékből álló keveréket adtunk az 50 μ l végtérfogatú reakcióelegyhez. A metiltransferáz reakció 30°C-on 2 órán keresztül zajlott 5 nM rPP1c δ , 25 nM Flag-MYPT1 vagy ezek keverékének jelenlétében vagy hiányában. A metilált hiszton fehérjéket tartalmazó mintákat Western blot módszerrel és szimmetrikusan dimetilált H2AR3 és H4R3 elleni antitestekkel elemeztük. A szimmetrikus dimetiláció mértékét a H2A és H4 mennyiségéhez viszonyítottuk.

Szövetminták dot blot elemzése

25 klinikai esetből származó humán májtumor és normál szövetmintát, valamint 15 közönséges rákos sejtlizátumot triplikátumban tartalmazó SomaPlex fehérje microarray slide-okat elemeztünk 3% BSA-val történő blokkolást követően anti-phospho-PRMT5^{T80}, -phospho-MYPT1^{T850} és -histone H2A antitestek segítségével. HRP-konjugált másodlagos antitest alkalmazását követően a slide-okat ECL eljárással röntgen filmen hívtuk elő. A fent említett antitestek sztrippeléssel történő eltávolítását követően a slide-ok elemzését anti-PRMT5, - MYPT1¹⁻²⁹⁶, H2AR3me2s és α -tubulin antitestekkel is elvégeztük. Az eredményeket denzitometriás eljárással normalizáltuk a megfelelő tubulin belső kontroll fehérje mennyiségéhez. A PRMT5 Thr⁸⁰ és MYPT1 Thr⁸⁵⁰ oldalláncok foszforilációjának szintjét, illetve a H2AR3 dimetilációjának szintjét a PRMT5, MYPT1 és H2A fehérjék mennyiségéhez viszonyítottuk. A tumoros mintákhoz tartozó értékeket a normál mintákhoz viszonyított relatív értékben adtuk meg.

Statisztikai analízis

A normalizált adatok statisztikai kiértékelését parametrikus összehasonlításban két csoport esetén t-teszt segítségével, 2-nél több csoport esetén egyutas ANOVA vagy általános lineáris modell (GLM) alkalmazásával végeztük. Varianciaanalízis során Tukey-tesztet alkalmaztunk. Ahol szimbólumok helyett betűkkel jelöltük az eltéréseket, az azonos betűvel rendelkező csoportok között nem találtunk szignifikáns eltérést. Az adatokat átlag \pm SE vagy SEM értékekben adtuk meg, ahol n a független kísérletek számát jelenti.

EREDMÉNYEK

A MP sejten belüli lokalizációja és a sejtmagi Flag-MYPT1 interaktóm HepG2 sejtekben

A miozin foszfatáz sejten belüli lokalizációjának vizsgálatát HepG2 sejtekből preparált szubcelluláris frakciók Western blot analízisével végeztük anti-MYPT¹⁻²⁹⁶, - PP1c δ , valamint a PP1 α és PP1 γ katalitikus alegység izoformákat is felismerő antitestek segítségével. A MYPT1, PP1 α / γ 1 és PP1c δ jelenlétét a citoplazmában és a sejtmagban is kimutattuk. Kimutattuk a MYPT1 és PP1c δ sejtmagi és citoplazmatikus kolokalizációját HepG2 sejtekben konfokális mikroszkópiával, mely a miozin foszfatáz sejtmagi jelenlétére utal. A MYPT1 nem mutatott kolokalizációt a sejtmagvacskával, és nem volt jelen a sejtmembrán területén. A splicing faktor kompartmentek területén megfigyelhető MYPT1 festődés alapján a miozin foszfatáz azonban megtalálható a spliceoszómákban, illetve sejtmagi kolokalizációt mutatott a hiszton H1b fehérjével is. Ezen adatok arra utalnak, hogy a MYPT1 a pre-mRNS-éréshez szükséges kofaktorokhoz irányítja a PP1c δ -t és szerepet játszhat a kromatin szerkezet szerveződésében.

A MP sejtmagi kölcsönható fehérjéinek meghatározásához HepG2 sejtmag frakció felhasználásával Flag-MYPT1 pull down kísérletet végeztünk, a kölcsönható fehérjéket ezüstoffestéssel detektáltuk, majd tömegspektrometriás elemzéssel azonosítottuk, melyek főként az RNS érés folyamatában, a splicing és génextpresszió során játszanak szerepet. A metiloszóma komplex mindhárom tagját azonosítottuk a magi Flag-MYPT1 interaktómban (PRMT5, PICln, MEP50), melyek közül a PRMT5 enzim a fehérjék arginin oldalláncának ω -N^G, N^G-szimmetrikus dimetilációját (SDMA) katalizálja és részt vesz a transzkripció, az RNS transzport és a jelátviteli folyamatok szabályozásában.

A MYPT1 és PRMT5 közötti kölcsönhatás vizsgálata

Konfokális mikroszkópiával kimutattuk a MYPT1 sejtmagi és citoplazmatikus kolokalizációját a metiloszóma komplex MEP50 és PRMT5 tagjaival HepG2 sejtekben, melyet a Pearson-féle kolokalizációs koeficiens meghatározásával számszerűsítettünk. Míg a MEP50 és PICln fehérjék 2-2, addig a PRMT5 pedig 8 peptidtalálattal lett azonosítva a Flag-MYPT1 interaktómban, és mivel a PRMT5 felelős a metiloszóma komplex katalitikus aktivitásáért, a továbbiakban a MYPT1 PRMT5-el való kölcsönhatását vizsgáltuk. Immunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk a két fehérje közötti kapcsolatot, majd SPR kötődési kísérlettel bizonyítottuk, hogy közvetlenül is kötődnek egymáshoz. A PRMT5 egyaránt asszociálódott a teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ és az N-terminális His-MYPT1¹⁻⁶³³ fehérjékhez, azonban nem kötődött a C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ fragmentumhoz, mely alapján feltételezhetően a MYPT1 N-terminális szakasza biztosítja a PRMT5 fehérje kötődését.

A PRMT5 fehérje a ROK és MP enzim pár szubsztrátja

Sikeresen foszforiláltuk a rekombináns Flag-PRMT5 fehérjét ROK alkalmazásával radioaktív ATP (γ - ^{32}P -ATP) szubsztrát jelenlétében, míg protein kináz A és C enzimek jelenlétében a foszforiláció nem volt sikeres. A foszforilált fehérjék tömegspektrometriás analízisével a PRMT5 fehérje Thr⁸⁰ oldalláncát, mint specifikus ROK foszforilációs helyet azonosítottuk, majd a Thr⁸⁰ oldallánc ROK általi foszforilációját Western blot analízissel is igazoltuk *in vitro* kináz assay-t követően anti-foszfo-PRMT5^{T80} antitest segítségével. Ezt erősíti, hogy a PRMT5 Thr⁸⁰ oldallánc foszforilációja H1152 szelektív ROK inhibitor alkalmazásával közel 50%-al csökkent. Emellett Flag-MYPT1 és rekombináns PP1 δ enzimek együttes alkalmazása mellett ~63%-al csökkent a ROK-al foszforilált Flag-PRMT5^{T80} foszforilációs szintje, míg a PP1 δ önmagában is ~36%-al csökkentette a Thr⁸⁰ foszforilációt. A PRMT5 Thr⁸⁰ PP1 δ általi fokozott defoszforilációja MYPT1 jelenlétében a MYPT1 célirányító szerepére utal a MP által katalizált defoszforiláció során.

A Thr⁸⁰ oldallánc foszforilációjának hatása a PRMT5 metiltransferáz aktivitására

A Thr⁸⁰ foszforiláció PRMT5 fehérjére gyakorolt hatását az enzim metiltransferáz aktivitásának vizsgálatával végeztük *in vitro* kísérletek révén. A hiszton 4 és 2A fehérjék Arg3 oldalláncának szimmetrikus dimetilációja csökkent (H4R3 46%-al, H2AR3 64%-al) a miozin foszfátáz jelenlétében történő PRMT5 Thr⁸⁰ defoszforiláció következtében, míg a PRMT5 fehérjéhez kötődő MEP50 mennyisége nem változott a foszforiláció/defoszforiláció hatására. Mivel a PRMT5 aktivitásához szükséges MEP50 mennyiségét nem befolyásolja a PRMT5 ROK általi foszforilációja, megállapíthatjuk, hogy a MP nem a kötődő MEP50 mennyiségétől függően gátolja a PRMT5 aktivitását. HepG2 sejtekben MYPT1 csendesítés hatására a PRMT5 Thr⁸⁰ foszforilációja mintegy 46%-al megemelkedett, és 40 illetve 45%-al növekedett a H2AR3 és H4R3 oldalláncok szimmetrikus dimetilációja, míg a hiszton fehérjék mennyisége nem változott. A fenti eredményeket kvantitatív módszerrel is megerősítettük. MYPT1 csendesített HepG2 sejtmagi frakciókban a specifikus PRMT5 aktivitás 65%-al emelkedett a non-target kontroll sejtek magfrakciójához képest, és hasonló tendenciát tapasztaltunk MCF7 emlőkarcinóma sejtek magi frakcióiban is az siMYPT1 kezelés hatására. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a Thr⁸⁰ oldallánc a PRMT5 működését szabályozó foszforilációs hely, és míg foszforiláció hatására emelkedik, addig defoszforiláció hatására csökken az enzim metiltransferáz aktivitása.

A MYPT1 csendesítése megváltozott génexpressziós mintázatot eredményez HepG2 sejtekben

A miozin foszfátáz hiszton fehérjék dimetilációjának szabályozásához kapcsolódó funkciójának pontosabb meghatározására microarray analízist végeztünk az Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array alkalmazásával. A non-target kontroll és siMYPT1 HepG2 sejtekből származó minták

összehasonlítása során 2429 gén mutatott megváltozott expressziós mintázatot a két csoport között. A bioinformatikai analízis eredményét különböző szabályozási útvonalakkal összevetve változást mutatott például az RXR-funkció (PPAR α , γ , IL1R, JUN) LPS/IL-1 útvonal általi gátlása, a C-vitamin antioxidáns hatása (STAT5, MAPK3 and 9), a sejtciklus szabályozása (Not7, PPP2C, CDK2, E2F3, Rb protein) vagy az IL-4 és IL-8 jelátviteli útvonal. Az összes érintett gén 39.5%-a kapcsolódik valamilyen daganatos megbetegedéshez, mint pl. limfohaematopoetikus-, máj- vagy emlőrák és vesesejtes karcinóma képződése. Fertőző betegségekhez és fejlődési zavarokhoz kapcsolódó géneket 10,9% -ban és 6,99% -ban azonosítottunk. A nagy számban azonosított jelátviteli útvonalak a MP génextpresszió szabályozásában betöltött szerepére utalnak. Számos tumorsuppresszor és transzkripció factor expressziója jelentős mértékben csökkent a MYPT1 csendesítés hatására, mint pl. a retinoblasztóma és c-Myc fehérje esetében. A microarray adatok előállítását és elemzését az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd. (Debrecen) végezte.

A MP daganatos betegségekben betöltött szerepe a PRMT5 szabályozásán keresztül

A microarray elemzés tükrében elmondható, hogy a MYPT1 funkciójának kiesése a daganatos elváltozások irányába tolhatja el az egyensúlyt a sejtekben. Ennek további tanulmányozása érdekében humán alanyokból származó, különböző stádiumú hepatocelluláris karcinóma (HCC, n=20) és metasztatikus májtumor lizátumot, valamint 15 tumoros sejtvonalat vizsgáltunk meg a PRMT5 Thr⁸⁰ és MYPT1 Thr⁸⁵⁰ foszforiláció, illetve a H2AR3 szimmetrikus dimetiláció mértékének tekintetében. A PRMT5 mennyisége 75%-al emelkedett a különböző tumor típusok esetén az egészséges kontroll mintákhoz viszonyítva. A legnagyobb eltérést THP-1 monocitás leukémia, Raji Burkitt limfóma, epidermoid és méh karcinóma esetén tapasztaltuk. A fehérjemennyiséggel párhuzamosan a PRMT5 Thr⁸⁰ foszforilációja is emelkedett különösen leukémia, limfóma, tüdő, máj és mell karcinóma valamint a HCC mintákban egyaránt. A MYPT1 relatív expressziójában mutatkozó változások nem mutattak ennyire egységes mintázatot. Volt ahol csökkenést tapasztaltunk, máshol kétszeresére emelkedett a MYPT1 mennyisége, és a vizsgált tumor típus 60%-ánál nem találtunk eltérést egészséges kontrolljaikhoz képest. Azonban majdnem minden esetben emelkedett a MYPT1 gátló Thr⁸⁵⁰ oldalláncának foszforilációja. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a PRMT5 emelkedett aktivitása és hisztonok szimmetrikus dimetilációján keresztül kifejtett génextpresszálo hatása egyértelműen összefüggésbe hozható a MP csökkent mértékű aktivitásával szinten minden vizsgált tumor típus esetében, és a ROK/MP/PRMT5/hiszton dimetilációs útvonal a tumorigenezis folyamatában betöltött jelentőségére utalnak.

A MYPT1 és SMTNL1 közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás

Mivel a MP a citoskeletonhoz köthető változások mellett jelentős szerepet játszik egyéb szabályozási folyamatokban is, mint pl. a génextpresszió szabályozásában, további szabályozási lehetőségeit is vizsgálni kívántuk, többek között az SMTNL1, egy a MP-t gátló fehérjén keresztül. SPR alapú kötődési kísérletekkel megvizsgáltuk a két fehérje közötti közvetlen kölcsönhatást (nem publikált eredmény). Teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴, N-terminális His-MYPT1¹⁻⁶³³ és C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ fehérjéket immobilizáltunk CM5 szenzor chipre, és Flag-SMTNL1 fehérjét áramoltattunk át a felszíneken 0,5 és 7,14 μM koncentráció tartományban. Az SMTNL1 fehérje egyaránt kötődött mindhárom MYPT1 fragmentumhoz, és stabil komplexet alakított ki a teljes hosszúságú fehérjével valamint a MYPT1 N-terminális végével. Alacsonyabb rezonancia jelet detektáltunk a MYPT1 C-terminális felét prezentáló fehérje esetén, amely arra utal, hogy bár gyengébb az SMTNL1 asszociációja a MYPT1 C-terminális végéhez, de szükséges lehet a két fehérje közötti stabil kölcsönhatás kialakításában.

A terhesség és az SMTNL1 indukálta izotípusváltás egér és humán vázizomzatban

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk az SMTNL1 terhesség során kifejtett hatását, terhes és nem-terhes egerekből származó vázizom mintákat elemeztünk Western blot technikával. Az SMTNL1 expressziója jelentősen megemelkedett terhesség és álterhesség hatására a nem-terhes egyedekhez viszonyítva, és az SMTNL1 Ser³⁰¹ oldalláncának foszforiláció 3,5-szeres emelkedést mutatott terhesség hatására. Rágcsáló és humán vázizom minták izomrost-típuszálása során a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok esetében szignifikáns emelkedést, míg a 2a típusú oxidatívabb rostok esetében tendenciális csökkenést tapasztaltunk SMTNL1 hiányos egerekben terhesség hatására. A szövetminták immunhisztokémiás elemzése alapján pedig elmondhatjuk, hogy vad típusú nem-terhes egerek vázizmában az SMTNL1 expressziója a 2a típusú rostokra korlátozódik, míg terhesség hatására más, a 2a típustól eltérő rostokban is expresszálódik SMTNL1, mint például a 2a-2b átalakulás alatt álló 2x típusú izomrostokban. Terhesség és ál-terhesség hatására 15-20%-al megemelkedett a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok száma, míg nem volt hatásuk az 1-es típusú oxidatívabb izotípus számára. A 2a típusú izomrostok indikátoraként ismert MHC2a expressziója csökkent, de nem szignifikáns mértékben, míg az MHC2b expresszió 20%-os emelkedést mutatott humán vázizom mintákban, mely a terhesség hatására bekövetkező oxidatívból glikolitikusabb típusba történő átalakulást mutatja. A 2b típusú rostok számának növekedése mellett 24%-al emelkedett az izomrostok glikogén tartalma. Ezen adatok tükrében arra következtethetünk, hogy a terhesség során a vázizomzat oxidatívból glikolitikusabb típusba történő fenotípusváltása játszódik le, és hogy az SMTNL1 szabályozó szerepet játszhat ebben a folyamatban.

ÖSSZEFOGLALÁS

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy szerin/treonin specifikus protein foszfatáz, mely egy PP1 ϵ katalitikus, egy miozin foszfatáz szabályozó alegységből (MYPT1) és egy 20 kDa eddig ismeretlen funkciójú alegységből áll. Hepatocelluláris karcinóma sejtekben a MYPT1 új kölcsönhatójaként azonosítottuk a metiloszóma komplex egyik tagját, a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5) enzimet. A PRMT5 fehérje Thr⁸⁰ oldallánca a MP és a RhoA-asszociált kináz (ROK) által katalizált foszforiláció révén szabályozódik. MYPT1 csendesítés hatására megemelkedett a PRMT5 által katalizált szimmetrikus dimetiláció a hiszton 2A és 4 fehérjék arginin oldalláncain, mely a celluláris folyamatokat befolyásoló gének expresszióját, mint pl. növekedés, proliferáció és sejthalál, valamint a retinoblasztóma és a c-Myc fehérjék kifejeződését is nagymértékben befolyásolta. A MYPT1 Thr⁸⁵⁰ gátló foszforilációs helyének emelkedett foszforilációjával összhangban a PRMT5 foszforilációja a Thr⁸⁰ oldalláncon, valamint a H2A szimmetrikus dimetilációja is fokozódott humán májsejtes karcinóma és egyéb tumor típusok esetében. Eredményeink alapján a ROK és MP enzimpár a PRMT5 fehérjére gyakorolt hatásukon keresztül részt vesznek a hisztonok szimmetrikus dimetilációjának módosításában, ezáltal modulálva a génextpressziót és szabályozva a tumor képződés folyamatát.

A MP aktivitását szabályozó egyik fehérje a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1), mely részt vesz a sima- és vázizomzat kontraktilitásának szabályozásában valamint azok fiziológias stressz hatására történő adaptációjában. Az SMTNL1 a sejtek citoplazmájában hatással van a MP aktivitására, ezáltal szabályozva az izom összehúzódnás folyamatát. SPR kötődési kísérletekkel igazoltuk a két fehérje, azaz az SMTNL1 és a MP szabályozó alegysége, a MYPT1 között kialakuló közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatást.

A terhesség állapotával járó fiziológiai változásokra adott válaszként a vázizomzat metabolikus tulajdonságai megváltoznak és az SMTNL1 fokozott expressziója figyelhető meg a méh és a vérerek simaizomzatában valamint a nemi hormonokra érzékeny szövetekben. Vizsgálataink során vázizomrostokban a terhesség hatására bekövetkező oxidatívból glikolitikusabb állapotba történő izotípusváltást mutattunk ki. Feltételezéseink szerint ez a folyamat az SMTNL1 szabályozása alatt áll a különböző transzkripciós és enzim regulátorok és szerkezeti molekulák expressziójának módosításán keresztül. Feltételezhetően ez a folyamat egy a terhességre adott normál, az anya számára evolúciós előnyt jelentő, a magzat fejlődését és védelmét biztosító válasz.



Nyilvántartási szám: DEENK/53/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sipos Adrienn
Neptun kód: I0DSCU
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037471

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sipos, A.**, Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., Tamás, I., Horváth, D., Medzihradzky-Fölkl, K., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells.
Sci. Rep. 7 (40590), 1-15, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40590>
IF: 5.228 (2015)
2. Lontay, B., Bodoor, K., **Sipos, A.**, Weitzel, D. H., Loisel, D., Safi, R., Zheng, D., Devente, J., Hickner, R. C., McDonnell, D. P., Ribar, T., Haystead, T. A. J.: Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice.
J. Biol. Chem. 290 (29), 17985-17998, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.658120>
IF: 4.258





További közlemények

3. Decinszki, D., **Sipos, A.**, Kiss, A., Bátori, R., Kónya, Z., Virág, L., Erdődi, F., Lontay, B.: Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1852 (1), 22-33, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2014.11.005>
IF: 5.158

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,644

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,486

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, 2017.03.10.

