

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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

„...bármilyen hitvány
Volt eszmém, akkor mégis lelkesített.
Emelt, és így nagy és szent eszme volt.
Mindegy kereszt, vagy tudomány, szabadság
Vagy nagyravágy formájában hatott-e,
Előre vitte az emberemet. –
Óh, vissza hát a földre, új csatára.”

Madách Imre: Az ember tragédiája, Tizenharmadik szín

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	3
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
3. BEVEZETÉS	8
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
4.1. A vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciója	9
4.2. A fehérje foszforiláció és defoszforiláció hatása a vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciójára	10
4.2.1. Reverzibilis fehérje foszforiláció	10
4.2.2. A foszfo-Ser/Thr specifikus protein foszfatázok osztályozása	12
4.2.2.1. Protein foszfatáz 1	13
4.2.2.2. Protein foszfatáz 2A és 2B.....	14
4.2.3. A vaszkuláris endotél sejtek közötti kapcsolatok szabályozása reverzibilis foszforilációval	15
4.2.4. A vaszkuláris endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozása reverzibilis foszforilációval	16
4.2.5. A miozin foszfatáz enzim és regulátor alegységeinek szerepe az endotél sejtek barrier funkciójában	18
4.2.5.1. A miozin foszfatáz holoenzim felépítése és szabályozása.....	18
4.2.5.2. A MYPT fehérjecsalád	18
4.2.5.3. TIMAP fehérje, a MYPT fehérjecsalád tagja	19
4.3. Az eEF1A1 fehérje	22
4.4. A merlin fehérje.....	23
5. CÉLKITŰZÉSEK	27
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
6.1. Anyagok	28
6.1.1. Reagensek és vegyszerek	28
6.1.2. Pufferek, oldatok és táptalajok	28
6.1.3. Baktériumtörzsek	29
6.1.4. Oligonukleotidok.....	29
6.2. Módszerek	31
6.2.1. Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakció (PCR).....	31
6.2.2. Plazmidok, klónozás.....	31

6.2.2.1.	Agaróz gélelektroforézis, a DNS kinyerése agaróz gélből	33
6.2.2.2.	Restrikciós emésztés	33
6.2.2.3.	Ligálás.....	33
6.2.2.4.	Kompetens sejtek előállítása.....	33
6.2.2.5.	Transzformálás.....	34
6.2.2.6.	Plazmid preparálás	34
6.2.2.7.	DNS szekvenálás	34
6.2.3.	A fúziós fehérjék előállítása.....	34
6.2.4.	Az endotél sejtek tenyésztése	35
6.2.5.	Immunprecipitáció	36
6.2.6.	Endotél sejtek transzfecciója.....	36
6.2.6.1.	Endotél sejtek transzfecciója plazmidokkal	36
6.2.6.2.	Endotél sejtek transzfecciója siRNS-sel	36
6.2.7.	Immunfestés és konfokális mikroszkópia	37
6.2.8.	Szubcelluláris frakcionálás.....	38
6.2.9.	Affinitás kromatográfia és <i>in vitro</i> GST pull down assay.....	38
6.2.10.	SDS-PAGE és Western blot	39
6.2.11.	Az endotél sejtek specifikus foszfatázgátló kezelése.....	41
6.2.12.	LC-MS/MS analízis	41
6.2.13.	Statisztikai analízis	41
7.	EREDMÉNYEK.....	42
7.1.	A TIMAP új kölcsönható partnerének azonosítása	42
7.1.1.	Az eEF1A1 a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben	42
7.1.2.	A TIMAP és az eEF1A1 kölcsönhatásának szerkezeti elemzése	43
7.1.3.	A TD-NEM motívum szerepe a TIMAP és az eEF1A1 kölcsönhatásában és a TIMAP nukleáris exportjában.....	45
7.1.3.1.	A TIMAP TD-NEM szerű motívumát kódoló vad típusú és mutáns rövidített rekombináns fehérjék előállítása	45
7.1.3.2.	A TIMAP TD-NEM szerű motívuma esszenciális az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásban.....	48
7.1.3.3.	Az eEF1A1 fehérje szerepe a TIMAP sejtmagi exportjában.....	52
7.2.	A merlin és a PP1c-TIMAP komplex fehérje kölcsönhatásának vizsgálata	53
7.2.1.	Merlin izoformák vizsgálata vaszkuláris endotél sejtekben.....	53
7.2.2.	A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának detektálása	54

7.2.3.	Az endogén fehérjék kölcsönhatásának detektálása.....	55
7.2.4.	A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának feltérképezése	56
7.2.4.1.	A kölcsönhatás vizsgálata a TIMAP oldaláról.....	56
7.2.4.2.	A kölcsönhatás vizsgálata a merlin oldaláról.....	57
7.2.5.	A TIMAP csendesítés hatásának vizsgálata a merlin és PP1c-TIMAP kölcsönhatására, illetve a merlin foszforilációjára	61
7.2.6.	A PP1 enzim gátlása növeli a merlin Ser518 oldalláncának foszforilációs szintjét endotél sejtekben	63
8.	MEGBESZÉLÉS	65
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	72
10.	SUMMARY	73
11.	TÁRGYSZAVAK	74
12.	KEYWORDS	74
13.	IRODALOMJEGYZÉK	75
13.1.	A PhD értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke.....	75
13.2.	A PhD értekezés alapját képező saját közlemények jegyzéke	89
14.	KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK	90
14.1.	Konferencia előadások	90
14.2.	Konferencia poszterek.....	90
15.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	91
16.	FÜGGELÉK	92

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aa-tRNS	amino-acil-tRNS
AJ	adherens junkciók/sejtkapcsolatok
bp	bázispár
BPAEC	marha tüdő artéria endotél sejt
CsA	ciklosporin A
CPI-17	PKC-val aktiválódó 17 kDa-os fehérje
DAPI	2,4 diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetil szulfoxid
DSP	kettős specificitású foszfatáz
EC	endotél sejt
ECE-1	endotelin konvertáló enzim-1
ECL	nagy érzékenységű kemilumineszcenciás módszer
eEF1A1	eukarióta elongációs faktor 1 A 1
ERK	extracelluláris szignál-redukált kináz
ERM	ezrin-radixin-moezin
FBS	magzati borjúsérum
FERM	four-point-one, ezrin, radixin, moezin
GJ	réskapcsolatok
GST	glutation-S-transzferáz
His	hisztidin
HPAEC	humán tüdő artéria endotél sejt
HRP	tormaperoxidáz
IP	immunprecipitáció
IPTG	izopropil β -D-tiogalaktozid
LAMR1	nem-integrin laminin receptor 1
LB	Luria-Bertani tápfolyadék
LC-MS/MS	folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria
MBS85	miozin kötő alegység 85
MDCK	Madin-Darby kutya vese
MEM	minimum esszenciális médium/Eagle-féle médium
MLC	miozin könnyű lánc
MLCK	miozin könnyű lánc kináz
MP	miozin foszfatáz
mu	mutáns
MYPT	miozin foszfatáz regulátor alegység
NLS	sejtmagi lokalizációs szignál
OD	optikai denzitás
OS	okadánsav

PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAK	p21 aktivált kináz
PBS	foszfáttal puffereelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PECAM-1	trombocita endotél sejt adhéziós molekula 1
PKA	protein kináz A (cAMP függő protein kináz)
PKC	protein kináz C
PMA	forbol 12-mirisztát 13-acetát
PP1	protein foszfatáz 1
PP1c	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
PP1cδ	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység δ izoformája
PP2A	protein foszfatáz 2A
PP2B	protein foszfatáz 2B
PPP	foszfo-protein foszfatáz
PTP	foszfo-tirozin foszfatáz
RACK1	aktivált protein kináz C receptora
ROCK	Rho-asszociált protein kináz
RT	reverz transzkripció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Ser	szerin
TBS	Tris-sel puffereelt sóoldat
TBST	Tris-sel puffereelt sóoldat Tween-20-szal kiegészítve
TD-NEM	transzkripció-függő nukleáris export motívum
TGF-β1	transzformáló növekedési faktor β 1
Thr	treonin
TIMAP	TGF β -gátolt membrán asszociált fehérje
TJ	szoros sejtkapcsolat
TM	tautomicetin
TNF	tumor nekrozis faktor
Tris	tris-(hidroximetil)-amino-metán
Tyr	tirozin
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
wt	vad típus
YT	élesztőkivonat és tripton alapú médium
ZO-1	zonula okkludens fehérje-1

3. BEVEZETÉS

A vaszkuláris endotél sejtek konfluens sejtréteget képeznek az érrendszer belső felszínén, és jelentős szerepet töltenek be számos élettani és patológiás folyamatban. Az endotélium elválasztja a keringő vért a környező szövetektől és a kismolekulák mellett csak a fehérjék egy részének engedi az átjutást a vérből a szövetekbe.

Az endotél sejtek alakját és a barrier funkció fenntartását nagymértékben befolyásolja a kontraktilis és a feszítő erők egyensúlya. Ha ez az egyensúly felbomlik és eltolódik a kontraktilis erők irányába, barrier diszfunkció alakul ki. Az endotél barrier funkció zavara számos patológiás állapotban, illetve betegségben megfigyelhető, mint például gyulladásban, szepszisben, trombózisban, diabetes mellitusban, metasztatikus tumorképződés során, illetve akut tüdőszérülésben, vagy súlyosabb esetben az akut respirációs distressz szindrómában is. Az erek barrier diszfunkciójának negatív hatása van a gyógyszerek felszívódására is. A túlzott érpermeabilitás következtében a gyógyszer-molekulák feldúsulhatnak az intersticiális térben mellyel toxicitásuk lokálisan növekedhet, egyidejűleg szisztémás hatékonyságuk csökkenhet.

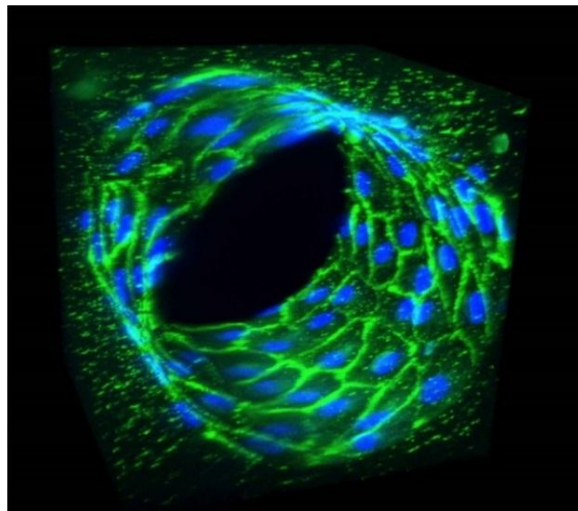
Az endotél sejtek alakjában és motilitásában fontos szerephez jut a sejtek citoskeletális és ehhez asszociálódó fehérjéinek reverzibilis foszforilációja. Endotél sejtekben a TIMAP (TGF β -gátolt membrán asszociált fehérje) a protein foszfatáz 1 (PP1) regulátor alegysége, egy magas szinten expresszálandó fehérje. A TIMAP PP1c-vel alkotott holoenzimként több endoteliális fehérje defoszforilációjában érintett, melyek hatással vannak az endotél sejtek alakjára illetve egyéb élettani folyamataira.

A disszertációban összefoglalt munka során két új TIMAP kölcsönható partner, az eukarióta elongációs faktor 1 A 1 (eEF1A1) és a moezin-ezrin-radixin like protein (merlin) azonosítását és jellemzését végeztük. Vizsgálataink új ismereteket fednek fel a TIMAP fehérje endotél sejtekben betöltött szerepéről.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciója

Az endotélium kifejezést Wilhelm His svájci anatómus használta először 1865-ben a testüregek belső sejtes rétegének a definiálására, megkülönböztetve az epitéliumtól (Aird, 2007). Az endotélium az emberi szervezet legnagyobb szerve, a mintegy $10\text{-}60 \times 10^{12}$ endotél sejt (EC) hozzávetőlegesen $300\text{-}1000 \text{ m}^2$ felületet borít be az erek belső felszínén (**4.1. ábra**) (Feletou, 2011). Az endotél sejtek legfontosabb feladata, hogy szemipermeábilis barrier 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 (Dejana, 2004; Mehta és Malik, 2006; Aird, 2007).



4.1. ábra. Humán köldökszínór-véna belső felszínét borító endotél sejtek. Konfokális mikroszkóppal készített 3D-s vetület. PECAM-1 fehérje (membrán marker) zölddel és a sejtmag kékkel festve. Forrás: <http://www.kurzweilai.net/new-device-yields-close-up-look-at-cancer-metastasis>

A normál barrier funkciót a sejt-sejt kapcsolatok, illetve az EC és az extracelluláris mátrix között kialakuló kölcsönhatás biztosítja (Dejana, 2004). Különböző fizikai, gyulladáso, és bioaktív ingerek megváltoztathatják az endotél sejtréteg barrier funkcióját, ami paracelluláris rések kialakulásához vezet, ennek következtében növekedett ér permeabilitás, majd végső esetben elégtelen szervfunkció alakulhat ki (Dudek és Garcia 2001; Mehta és Malik, 2006).

Az endotél sejtek fenotípusukat, morfológiájukat és élettani szerepüket tekintve is nagy heterogenitást mutatnak attól függően, hogy artériában vagy vénában helyezkednek el, vagy, hogy az adott ér milyen szervben található (Feletou, 2011). A sejtek közötti permeabilitás

alapján az endotéliumnak három fő típusát különböztetjük meg: (1) a folytonos endotéliumot (például tüdőben, illetve a folytonos endotélium különleges változatát képezi az agy és a retina kapillárisainak endotélje), (2) a fenesztrált (részben nyitott) endotéliumot, és végül (3) a diszkontinuus (vagyis hézagos) endotéliumot (Tuma és Hubbard, 2003; Hoffmann, 2004).

Az EC alakját és mozgékonyágát a citoszkeletális szerkezet aktin filamentumai, továbbá az aktomiozin rendszeren keresztül megvalósuló kontraktilis erők szabályozzák. Az endotél sejtek összehúzódása során az aktin polimerizációja, továbbá aktomiozin rostok (stresszkábelek) kialakulása figyelhető meg. Ismert, hogy az aktin polimerizáció és vele párhuzamosan az aktin-citoszkeleton átrendeződése megnövekedett érpermeabilitáshoz vezet, aminek tüdő ödéma lehet a következménye (Ermert és mtsai.,1995). Ugyanez a jelenség figyelhető meg a gyulladós ágens trombin hatására is, amikor aktin polimerizációt követően, a sejtek kortikális aktin filamentumai csökkennek, míg a stresszkábelek mennyisége növekszik (Schaphorst és mtsai., 1997; Ehringer és mtsai., 1999; Mehta és Malik, 2006). Ezzel ellentétben, ha a sejteket cytochalasin D-vel, egy aktin polimerizációt gátló szerrel kezelték, megszűnt a kontrakciós állapot (Goeckeler és Wysolmerski, 2005).

A folytonos endotéliumban a sejtek szoros illeszkedése transzmembrán adhézios fehérjéken keresztül valósul meg, melyek sejtkapcsolatokat (junkciók, junctions) hoznak létre a sejtek között. A szorosan illeszkedő endotél sejtekre a réskapcsolatok (gap junctions, GJ), szoros sejtkapcsolatok (tight junction, TJ) és az adherens kapcsolatok (adherent junctions, AJ) is jellemzőek. A GJ-k transzmembrán csatornákat alakítanak ki a sejtek között, míg a TJ-k és AJ-k a pericelluláris, folszerű kapcsolatokat létesítenek az EC között (Mehta és Malik, 2006).

Mind az EC extracelluláris mátrixhoz asszociálódó fehérjék, mind a sejtek között kialakuló különböző junkciók kialakításában részvevő fehérjék reverzibilis foszforilációja/defoszforilációja módosíthatja funkcióikat, egymáshoz való asszociációjukat, szabályozva ezzel az EC barrier funkciót.

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

4.2.1. Reverzibilis fehérje foszforiláció

A reverzibilis fehérje foszforiláció az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás az eukarióta sejtekben (Davies és mtsai., 2000). Fontos szerepet tölt be a sejtek növekedésében és számos sejtelettani folyamatban, többek között a sejtciklusban, az apoptózisban, a sejtek differenciációjában és jelátvitelében (Cohen, 1997; Jackson és Denu, 2001; Shi, 2009).

A fehérjék foszforilációját protein kináz enzimek katalizálják, amely folyamat során nukleozid trifoszfátok (legtöbb esetben ATP, néhány esetben GTP) γ -foszfátcsoportja beépül a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr), tirozin (Tyr), vagy ritkábban hisztidin (His) oldalláncába (Hunter, 1995; Attwood és mtsai., 2007). A folyamat megfordíthatóságát a protein foszfatázok biztosítják azáltal, hogy lehetővé teszik a fehérjékben az észter kötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisét (Cohen, 1989). A negatív töltésű foszfát csoport beépülése hatással van a fehérjék biológiai aktivitására. A fehérjék pillanatnyi foszforiláltsági szintjét a kináz és foszfatáz enzimek aktivitásának aránya határozza meg (Shi, 2009). A fehérje foszforiláció jelentőségét mutatja, hogy az intracelluláris fehérjék 30%-a foszfoprotein, és hogy a protein kinázokat és foszfatázokat kódoló gének az eukarióta genom mintegy 4%-át adják. A protein kinázok és foszfatázok működésében bekövetkezett rendellenesség számos betegség okozója lehet; például daganatok, vagy immunológiai betegségek kialakulásához vezethet (Barford, 1995).

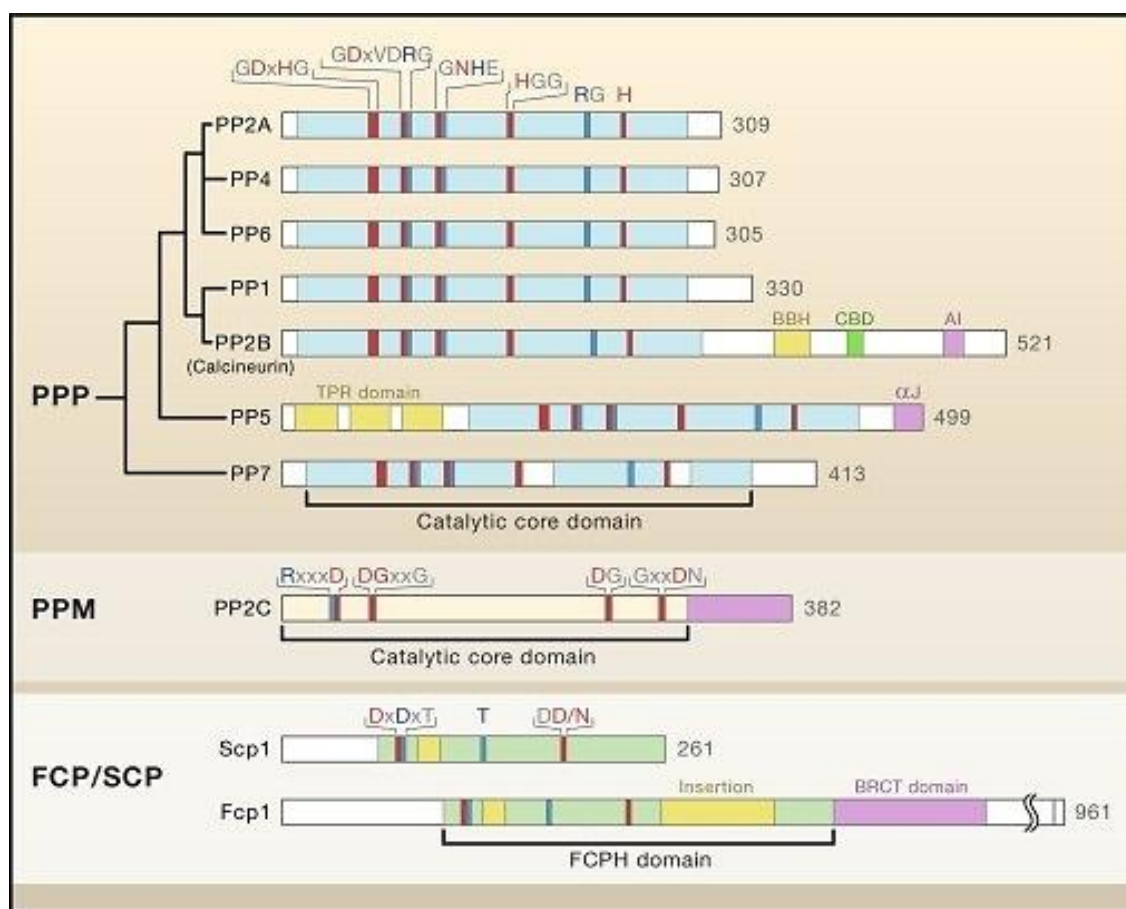
A protein kináz enzimek változatos szabályozási módot mutatnak és széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek. Aminosav szekvenciájukban több konzervált motívum jelenik meg, melyek magyarázatot adnak arra, hogy a diverz fehérjéknek hogyan sikerül ellátni azonos funkciójukat. Szerkezetükre jellemző a kináz aktivitásáért felelős katalitikus domén és szabályozó domén. Egyik csoportosításuk azon alapul, hogy az enzim a foszfátcsoportot a szubsztrát melyik oldalláncára kapcsolja. E szerint Ser/Thr és Tyr, vagy kettős specificitású protein kinázokat ismerünk, melyek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncát egyaránt képesek foszforilálni. Az osztályozás a katalitikus domének aminosav szekvenciája szerint is történhet. Ezen felül megkülönböztetünk receptor, és nem receptor kinázokat (Hanks és Hunter, 1995). A humán genomban a protein kinázok számát 500-nál is többre becsülik (Manning és mtsai., 2002). Ezek közül 400 olyan kinázt ismerünk, amelyek a fehérjék Ser/Thr oldalláncához kapcsolják a foszfát csoportot, vagy kettős specificitásúak (Venter és mtsai., 2001).

Az eukarióta protein foszfatázok három gencsalád 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 (Barford és mtsai., 1998). A defoszforiláció mechanizmusát tekintve a Ser/Thr specifikus foszfatázok a foszfátcsoport közvetlen hidrolízisét katalizálják, míg a Tyr specifikus foszfatázok egy tiofoszforil intermedieren keresztül távolítják el a foszfátcsoportot (Denu és Dixon, 1998). A protein

foszfatázokat kódoló gének száma körülbelül 100, amiből csupán 15, ami a fehérjék foszfo-Ser/Thr oldalláncán lévő foszfátcsoport lehasítását katalizálja (Venter és mtsai., 2001).

4.2.2. A foszfo-Ser/Thr specifikus protein foszfatázok osztályozása

A foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok három csoportra, azon belül további alcsoportokra bonthatók (4.2. ábra). 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 (Shi, 2009).



4.2. ábra. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása. (Shi, 2009)

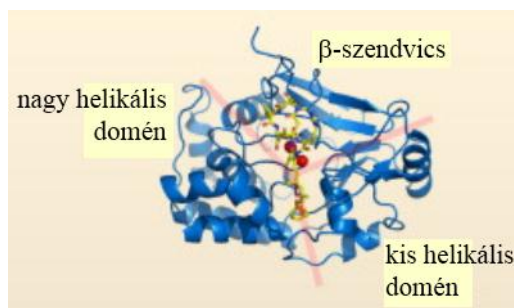
Fémion függőségük alapján a PP2 enzimek további két alcsoportra oszthatók: a PP2A enzim működéséhez nem szükséges fémion, míg a PP2B (más néven calcineurin) Ca^{2+} függő. A PPM családba a Mg^{2+} -függő PP2C és a piruvát dehidrogenáz foszfatáz tartozik. A PP2C háromdimenziós szerkezete azonban nagymértékben hasonlít a PP2A és PP2B enzimekhez. A harmadik csoportot az úgynevezett aszpartát-alapú foszfatázok alkotják (Cohen, 1997; Csontos és mtsai., 2007; Shi, 2009).

A PPP holoenzimek egy katalitikus alegységből, továbbá egy, vagy több kapcsolódó regulátor alegységből állnak, mely így az enzim nagyfokú variabilitását teszi lehetővé (Csontos és mtsai., 2007; Shi, 2009).

4.2.2.1. Protein foszfatáz 1

A PP1 a foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok egyik legjelentősebb tagja, minden eukarióta sejtben expresszálódik. Kiemelten fontos szerepet tölt be számos sejtéletbeni folyamatban, például a sejtosztódásban, apoptózisban, fehérje szintézisben, metabolizmusban, citoskeletális szerveződésben, továbbá a membrán-receptorok és -csatornák működésének szabályozásában (Ceulemans és mtsai., 2002). 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. A PP1 enzim katalitikus alegysége az egyik legkonzerváltabb fehérje, az eukarióta szervezetekben körülbelül 70%-os, vagy akár magasabb szekvencia homológiát is mutathat (Cohen, 1997; Shi, 2009). Például, a *Homo sapiens* és a *Bos taurus* fajok között a PP1 katalitikus alegységének δ izoformája között 100%-os homológia figyelhető meg (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). 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 . A PP1 α két splice variánsa a PP1 α_1 és PP1 α_2 , a PP1 γ enzimé pedig a PP1 γ_1 és PP1 γ_2 (Cohen, 1988). Az egyes PP1c izoformák között nagyfokú a homológia (Shi, 2009). Szerkezeti modellje a **4.3. ábrán** látható: 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.



4.3. ábra. A PP1 enzim szerkezete. (Shi, 2009). Pirossal a Fe^{2+} és Mn^{2+} ionok az aktív centrumban, halvány rózsaszínnel az Y alakú árok van jelölve.

A két fémion szerepe a defoszforiláció folyamata során a nukleofil reakció iniciálása. A fémionok koordinálásában részt vevő esszenciális aminosavak (három hisztidin, két aszparaginsav és egy aszparagin) a PPP családra jellemzően konzerválódtak (Egloff és mtsai., 1995; Shi, 2009). A PP1c-hez 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, azonban mindegyik szekvenciájában azonosítottak egy rövid motívumot (R/KVxF), amit általánosan PP1c kötő motívumnak szoktak nevezni (Egloff és mtsai., 1997; Cohen, 2002). A PP1c kötő motívum a PP1c hidrofób árkához kötődik (Egloff és mtsai., 1997).

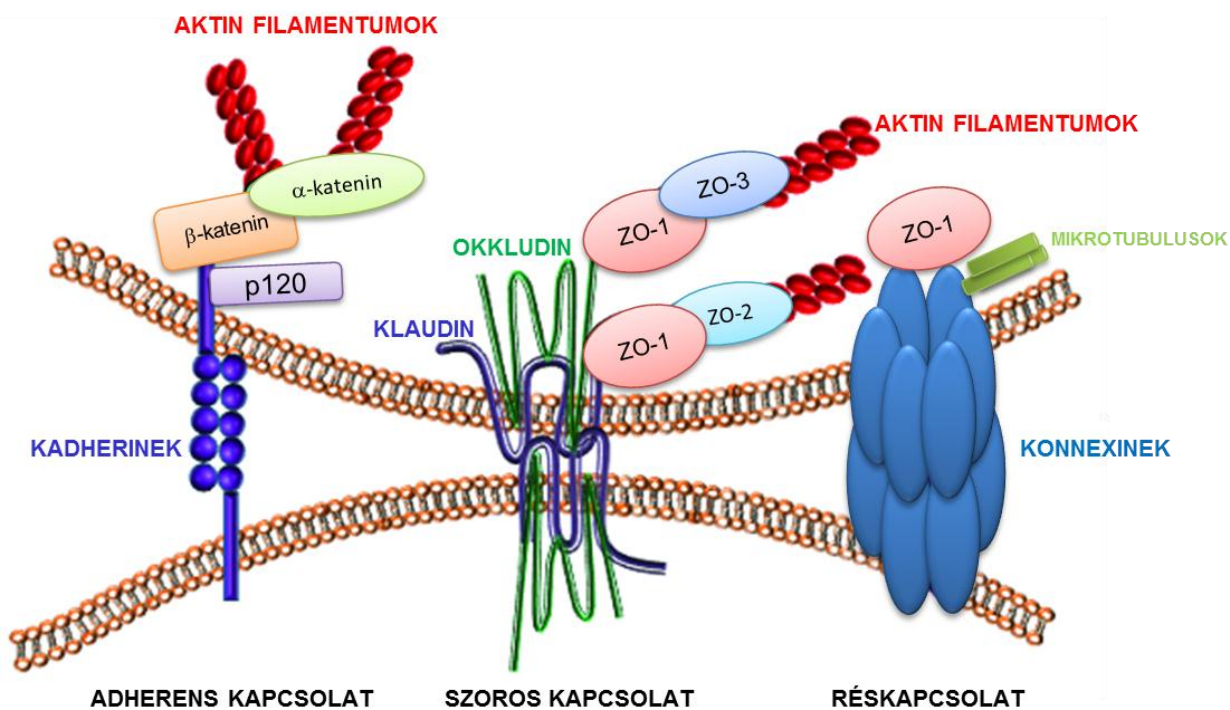
4.2.2.2. Protein foszfatáz 2A és 2B

A PP1-hez hasonlóan a PP2A enzim minden sejtben expresszálandó foszfatáz, ami a teljes sejt-fehérje tartalom 1%-át is kiteheti. A PP1 enzimmel együtt a Ser/Thr specifikus foszfatázok 90%-át adják (Depaoli-Roach és mtsai., 1994). Jelentőségét számos sejtéletteni folyamatban leírták (Zolnierowicz, 2000; Janssens és Goris, 2001). 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 (Eichhorn és mtsai., 2009). Az elnyúlt patkó alakú A alegység köti a C és a B alegységeket, ily módon a holoenzim összetartását biztosítja, a B alegység pedig az enzim szubsztrátspecifitására és sejtben belüli lokalizációjáért felelős (Janssens és Goris, 2001).

A protein foszfatáz 2B, vagy más néven kalcineurin a PPP családba tartozó Ca^{2+} /kalmódulin-függő protein foszfatáz, mely a Ca^{2+} ion kötésével válik aktív enzimmé (Aramburu és Klee, 2000; Rusnak és Mertz, 2000). Szerepét leírták többek között az idegrendszer fejlődésében és a memóriában, immunológiai válaszokban, izom adaptációban illetve több jelátviteli útvonalban (például NF- κ B, JNK, NFAT). A PP2B egy A katalitikus alegységből (kalcineurin A, CNA) és egy hozzá szorosan kapcsolódó konzerválódott Ca^{2+} -kötő B alegységből (kalcineurin B, CNB) áll (Klee és mtsai., 1979; Klee és mtsai., 1998; Shi, 2009). Az 58-69 kDa nagyságú A alegységnek három izoformája van (α , β és γ), a 16-19 kDa molekulatömegű B alegységnek pedig két izoformáját írták le (Klee és mtsai., 1998).

4.2.3. 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. A ZO-1 (zonula okkludens-1), a kateninek, a p120 katenin, illetve az aktinin mind olyan sejten belüli fehérjék melyek a VE-kadherin, konnexin, klaudin és okkludin integráns membránfehérjéket az EC citoszkeleton F-aktinjához illetve intermedier filamentumaihoz kötik (Dejana, 2004). A réskapcsolatok kialakításáért felelős konnexinek közvetlenül is kapcsolódhatnak a mikrotubulusokhoz (Giepmans, 2004) (4.4. ábra).



4.4. ábra. Az endotél sejtek intracelluláris kapcsolatainak sematikus ábrája. (Kása és mtsai., 2015, módosított ábra)

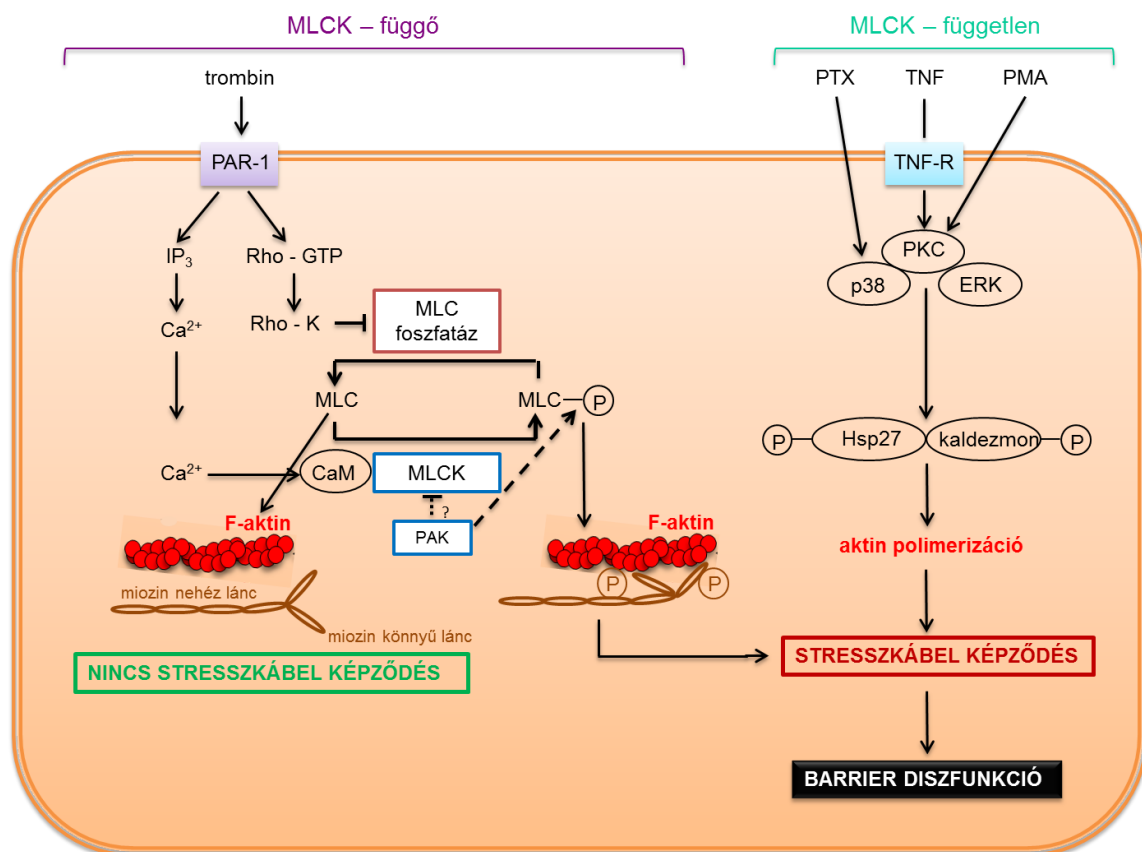
Az AJ és TJ kialakításában részvevő fehérjék foszforilációja a sejt-sejt kapcsolatok szerkezetét is módosítják, így szerepük van a barrier kialakításában. Az AJ-ban részt vevő egyik fontos fehérjének, a VE-kadherinnek a foszforilációja hozzájárul a β-kateninnel történő kölcsönhatásához, ugyanakkor a β-katenin foszforilációja negatív hatással van az interakcióra (Roura és mtsai., 1999; Huber és Weis, 2001). A PP2A Bα enzimről munkacsoportunk korábban leírta, hogy a VE-kadherin és β-katenin fehérjék defoszforilációján keresztül

szabályozza az endotél citoszkeleton szerkezetét (Kása és mtsai., 2013). A trombocita endotél sejt adhéziós molekula 1 (PECAM-1) szintén részt vesz a β -katenin foszforilációjának regulációjában, továbbá a proteoszóma mediált lebontásában (Biswas és mtsai., 2006). A vaszkuláris endoteliális növekedési faktorról (VEGF) szintén ismert, hogy érintett az sejt-sejt kapcsolatok kialakításában, ugyanis szabályozhatja az intracelluláris okkludin és ZO-1 fehérjék foszforilációját (Antonetti és mtsai., 1999). A gyulladás következtében felszabaduló hisztamin és VEGF hatására pedig a p120-katenin foszforilációs szintjének csökkenését tapasztalták (Wong és mtsai., 2000).

4.2.4. A vaszkuláris endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozása reverzibilis foszforilációval

Az EC citoszkeleton három, monomerekből felépülő polimer fehérje hálózat (aktin filamentumok, intermedier filamentumok és mikrotubulusok) alkotta dinamikus rendszer, mely gyors és jól szabályozott átrendeződésre képes, megszabva ezzel a sejtek alakját és motilitását (Dudek és Garcia, 2001). Az EC citoszkeleton barrier funkcióban betöltött szerepében is kiemelten fontos a fehérjék reverzibilis foszforilációja és defoszforilációja (Ceulemans és mtsai., 2002; Bogstcheva, 2008; Shi, 2009). Az EC barrier diszfunkciójában szerepet játszó útvonalakat alapvetően két csoportra oszthatjuk: miozin könnyű lánc kináz (MLCK) -függő, és -független folyamatokra (**4.5. ábra**) (Dudek és Garcia, 2001).

Az MLCK-függő útvonal során a trombin proteolízissel aktiválja a proteáz-aktivált receptor-1 (PAR-1)-et oly módon, hogy a trombin a PAR-1 N-terminális végéről proteolízissel lehasít egy rövid peptidszakaszt. Az így kialakult új N-terminális a PAR-1 liganduma, melynek a receptor extracelluláris doménjéhez való kötődése elindítja a jelátviteli folyamatokat. Inozitol trifoszfát (IP₃) koncentráció emelkedés következik be, melyet intracelluláris Ca²⁺ koncentráció növekedés követ. A Ca²⁺ ionkoncentrációjának emelkedése révén a Ca²⁺-kalmodulin kölcsönhatás aktiválja az MLCK-t, mely miozin könnyű lánc (MLC) foszforilációhoz vezet. A foszforiláció eredményeként aktomiozon interakció, illetve sejtkontrakció lép fel. A MLC foszforiláció másik lehetséges módja a Rho/Rho-kináz (ROK) útvonalon lehetséges: a Rho-GTP által aktivált Rho-kináz az MLC foszfátáz gátlásához vezet, ami az MLC foszforilációját, és következtében aktin stresszkábel képződését eredményezi (Dudek és Garcia, 2001).



4.5. ábra. A barrier diszfunkció kialakításában szerepet játszó MLCK-függő és MLCK-független útvonalak összefoglalása. Az ábra a Dudek és Garcia 2001-ben a *Journal of Applied Physiology* c. folyóiratban megjelent publikációjának egyik ábrája alapján készült.

Az MLCK-független jelátviteli út többféle ligand hatására is aktiválódhat, központjában azonban minden esetben a Hsp27 hőszokk fehérje illetve a kaldezmon foszforilációja áll. A pertusszis toxin (PTX) egy eddig ismeretlen útvonalon keresztül aktiválja a MAP kináz (MAPK) útvonal p38 fehérjéjét, ami a Hsp27 fehérje foszforilációját eredményezi, mely ezzel az aktin polimerizációt gátló hatását elveszítve, stresszkábel képződéshez és barrier diszfunkcióhoz vezet (Garcia és mtsai., 2002). PMA kezelés hatására BPAE sejtekben protein kináz C (PKC) enzimaktivitás emelkedés tapasztalható jelentős MLC foszforiláció nélkül, valószínűsíthetően az ERK-katalizált kaldezmon foszforiláció által, ami szintén aktin polimerizációhoz vezet (Bogatcheva és mtsai., 2006). Hasonlóképpen, a gyulladáscitokin, TNF- α receptorához történő kapcsolódása PKC-függő útvonalon éri el a citoskeletális átrendezést és a barrier diszfunkciót (Ferrero és mtsai., 2000). Bár a TNF- α -ról ismert, hogy pozitívan szabályozza az MLC foszforilációját, jelen esetben az EC barrier diszfunkciót ettől eltérően, MLC foszforiláció nélkül éri el (Dudek és Garcia, 2001). Szintén munkacsoportunk egy korábbi munkájából ismert, hogy a PP2A overexpressziója barrier védő hatással bír endotél

sejtekben azáltal, hogy defoszforilálja a Hsp27 és tau fehérjéket, melyek foszforilált formában aktin polimerizációt és stresszkábel képződést idéznek elő (Tar és mtsai., 2006).

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

4.2.5.1. A miozin foszfatáz holoenzim felépítése és szabályozása

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim három alegységből épül fel: a 38 kDa nagyságú PP1cδ 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 MYPT1 alegység szabályozza a holoenzim szubsztrátspecificitását és a PP1c aktivitását. Az M20 alegység funkciójáról sokáig kevés adat állt rendelkezésünkre, de ma már ismert, hogy a Rho kináz aktiválásával, hatással van a sejtek Ca²⁺ érzékenyítésére (Alessi, 1992; Hartshorne és mtsai., 1998a; Arimura et al., 2001; Shichi és mtsai., 2010).

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 (Hartshorne, 1998b; MacDonald és mtsai., 2001; Kiss és mtsai., 2002; Murányi és mtsai., 2002). A gátló helyek defoszforilációjában résztvevő foszfatázokról kevesebbet tudunk. A PP2A enzimről az irodalomból ismert, hogy a PP1c és MYPT gátló PKC-val aktiválódó 17 kDa-os fehérjét (CPI-17) defoszforilálja, ami által szabályozza a MP-t (Takizawa és mtsai., 2002). 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 (Kolozsvári és mtsai., 2012).

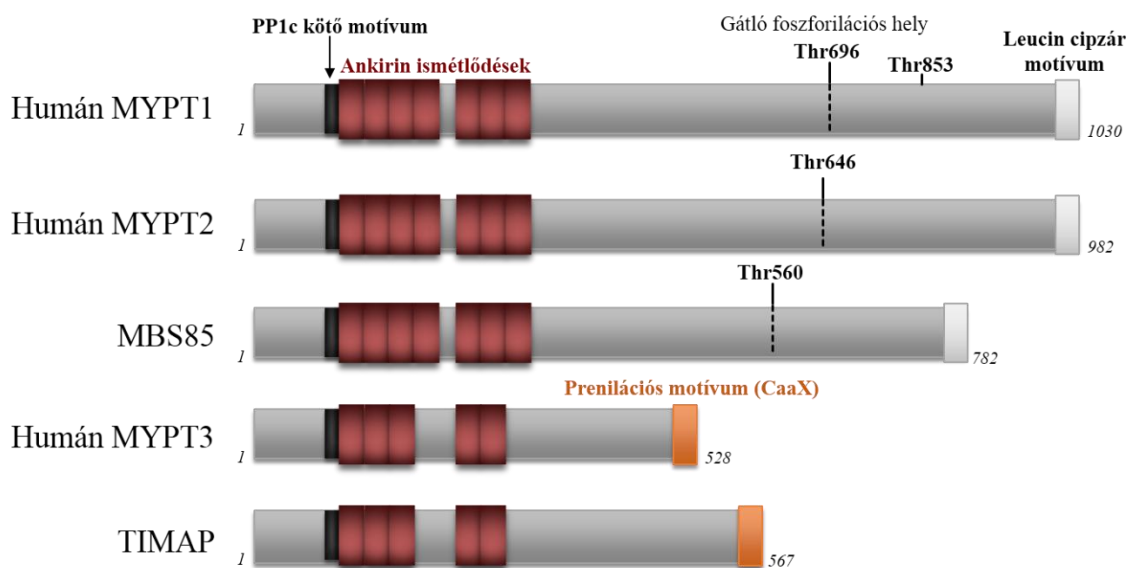
4.2.5.2. A MYPT fehérjecsalád

A miozin foszfatáz regulátor alegység (MYPT) fehérjecsalád tagjai közé soroljuk a MYPT1, MYPT2, MYPT3, miozin kötő alegység 85 (MBS85) és a TGFβ-gátolt membrán asszociált fehérje (TIMAP) fehérjéket.

A MYPT1 számos szövetben jelen van, de legnagyobb mennyiségben a simaizomban expresszálódik (Okubo és mtsai., 1994; Takahashi és mtsai., 1997; Boudrez et al., 1999). 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 (Ito és mtsai., 2004; Wu és mtsai., 2005). A fehérje C-terminális végén leucin cipzár motívum helyezkedik el (Hartshorne, 1998b). A 110 kDa molekulatömegű MYPT2 fehérje, ami a MYPT1-gyel 61%-os homológiát mutat, a vázizomban, a szívizomban és az agyban expresszálódik (Fujioka és mtsai., 1998; Grassie és mtsai., 2011). 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 (Grassie és mtsai., 2011). 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 (MYPT2: RVRF, MYPT3: KHVLF, MBS85: RTVRF, TIMAP: KVSF) (Ito és mtsai., 2004), továbbá az N-terminális közeli konzervált ankirin ismétlődések. Az MBS85 fehérjén a MYPT1 és MYPT2-höz hasonlóan a C-terminális végén található egy 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 (4.6. ábra) (Csortos és mtsai., 2007).



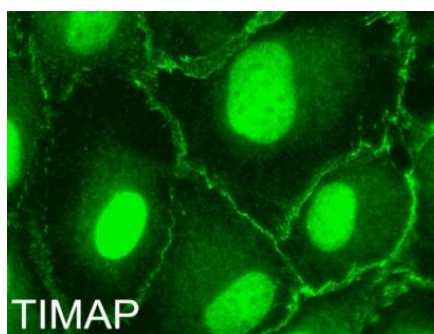
4.6. ábra. A MYPT fehérjecsalád. (Csortos és mtsai., 2007)

4.2.5.3. TIMAP fehérje, a MYPT fehérjecsalád tagja

A TIMAP egy 64 kDa molekulatömegű fehérje, melynek kódoló génje a humán 20-as kromoszóma q11.22-es régiójában helyezkedik el. Reprerentációs differenciál-analízis kísérlet során azonosították elsőként, amikor glomerulus endotél sejtek TGF- β 1-re adott válaszát vizsgálták. A kísérlet során a TGF- β 1 jelentősen csökkentette a TIMAP mRNS szintjét, ami

arra engedett következtetni, hogy a TIMAP fehérjének fontos szerepe lehet a TGF- β 1 által okozott változások helyreállításában, mint például apoptózis vagy barrier diszfunkció. Endotél sejtekben (azon belül is vaszkuláris endotél sejtekben) és hematopoetikus őssejtekben magas szinten expresszálódik más sejtípusokhoz képest (Cao és mtsai., 2002).

Szerkezeti hasonlóság alapján a MYPT fehérjecsald 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 (KVVSF). Ezt követi öt ankirin ismétlődés, majd C-terminális végén egy prenilációs motívum, a CAAX box, melynek a fehérje membrán lokalizációjában van szerepe (Cao és mtsai., 2002; Csontos és mtsai., 2007) (**4.6. ábra**). Szerkezeti jellegzetességeiből adódóan a TIMAP fehérje megtalálható az endotél sejtek plazmamembránjában és sejtmagjában egyaránt (**4.7. ábra**) (Csontos és mtsai., 2008), bár a sejtmagi lokalizáció fiziológiai szerepe eddig nem ismert.



4.7. ábra. A TIMAP membrán és sejtmagi lokalizációja HPAE sejtekben. (Csontos és mtsai., 2008)

A fehérjének a MYPT1 fehérjével való szerkezeti rokonsága alapján feltételezhető volt, hogy a PP1c regulátor alegységeként funkcionál. Munkacsoportunk megerősítette a feltételezést, továbbá igazolta, hogy a TIMAP a PP1c δ izomformájához kötődik specifikusan. A TIMAP foszforiláltsági szintje hatással van a PP1 enzim aktivitására. Mindezek mellett igazolódott, hogy a TIMAP foszforilációs helyei nem homológok a MYPT1 fehérje gátló foszforilációs helyeivel (Csontos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011).

TIMAP depletált humán tüdő artéria endotél sejtekben (HPAEC) a barrier funkciót csökkentő ágensek (trombin, nokodazol) hatása erősödött, míg a barrier funkciót védő anyagok (szfingozin-1-foszfát, ATP) hatása gyengült. Ezek az eredmények a TIMAP barrier funkció fenntartását elősegítő hatására utalnak (Csontos és mtsai., 2008). Az endotél sejtek lipopoliszacharid indukálta barrier diszfunkciójának vizsgálatakor szintén a TIMAP barrier védő hatása nyert bizonyosságot (Poirier és mtsai., 2011). Az a tény, hogy endotél sejtekben a

TIMAP a PP1c regulátor alegysége, felvetette a kérdést, hogy mely fehérjék lehetnek a holoenzim kölcsönható partnerei és szubsztrátjai. A **4.1. táblázatban** a már leírt kölcsönható partnereket soroltam fel.

4.1. táblázat. A TIMAP fehérje kölcsönható partnerei

TIMAP kölcsönható partner neve	A TIMAP szerepe az érintett kölcsönható partnerrel vizsgálva	Hivatkozás
PP1cδ	A TIMAP a PP1c δ regulátor alegysége	Kim és mtsai., 2005; Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011
ERM	A PP1c-TIMAP komplex részt vesz az ERM fehérjék defoszforilációjának szabályozásában.	Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011; Boratkó és Csortos, 2017
LAMR1	A LAMR1 a PP1c-TIMAP komplex kölcsönható partnere, a kölcsönhatás szerepe jelenleg nem ismert.	Kim és mtsai., 2005
MLC	Az MLC a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja.	Shopik és mtsai., 2013
RACK1	A RACK1 biztosítja a TIMAP és a farnezil-transzferáz enzim kölcsönhatását, majd a TIMAP prenilációját.	Boratkó és mtsai., 2013
ECE-1	Az ECE-1 a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja, a komplex szabályozza az endotelin-1 termelést az ECE-1 defoszforilációja által.	Boratkó és mtsai., 2016

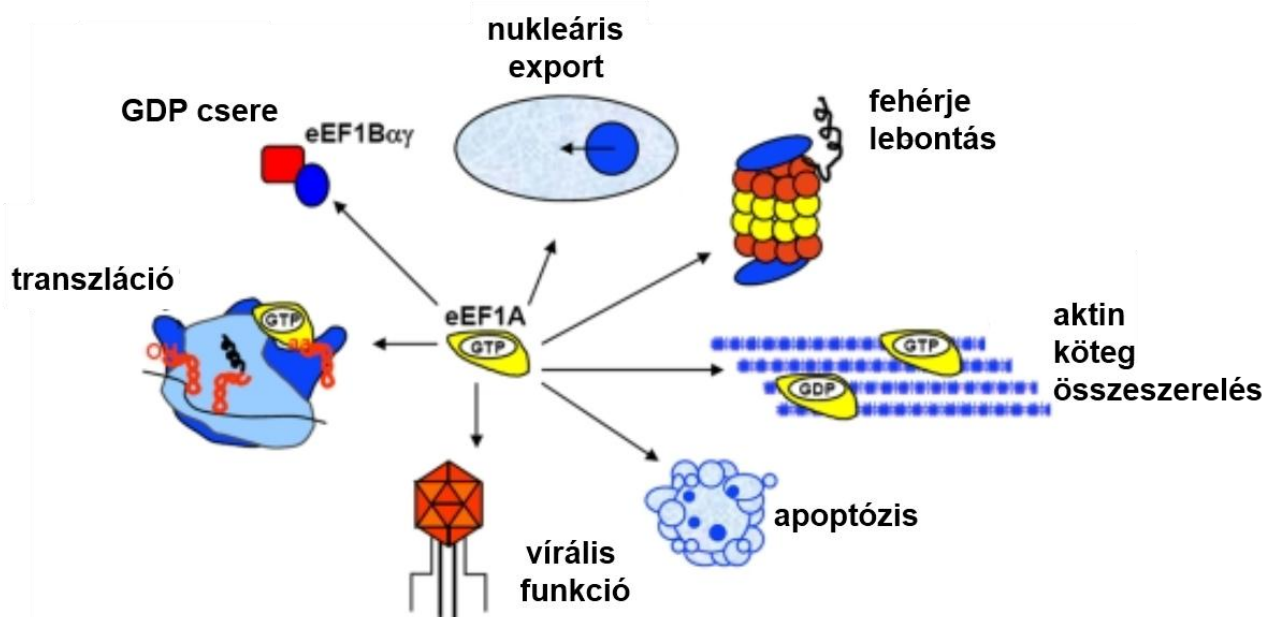
Munkacsoportunk vizsgálatai a TIMAP és az ezrin-radixin-moezin (ERM) fehérjék közötti kölcsönhatást tártak fel. Az ERM fehérjék az aktin filamentumokat kapcsolják a plazmamembrán fehérjeihez, így tehát szerepük van a sejtadhézióban és a sejtmozgásban. A PP1c-TIMAP komplex szerepet játszik az endotél barrier funkció fenntartásában az ERM fehérjék defoszforilációjának szabályozásával (Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011). Kim és munkatársai a laminin receptor 1 (LAMR1) fehérjét, mint TIMAP kölcsönható partnert azonosították, és leírták, hogy a LAMR1 a PP1c-TIMAP komplex feltételezett

szubsztrátja (Kim és mtsai., 2005), bár a munkacsoport újabb eredményei ezt cáfolják, és az MLC fehérjét jelölik meg a komplex szubsztrátjaként (Shopik és mtsai., 2013). A RACK1 (aktivált protein kináz C receptora 1) fehérje kölcsönhatását a TIMAP-pal munkacsoportunk azonosította. 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 (Boratkó és mtsai., 2013). Munkacsoportunk további eredménye alapján a PP1c-TIMAP 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 (Boratkó és mtsai., 2016).

4.3. Az eEF1A1 fehérje

Az eukarióta elongációs faktor 1 A (eEF1A) egy erősen konzerválódott fehérje, melynek számos sejten belüli folyamatban feltárták a szerepét. Az elsődleges funkciója a protein szintézis elongációs lépéséhez kötődik, ahol elősegíti az amino-acil-tRNS (aa-tRNS) GTP-függő kötődését a riboszómához (Lund és mtsai., 1996; Negrutskii és El'skaya, 1998). Az fehérje I. doménje a GTP kötéséért felelős, a II. domén pedig az aa-tRNS-t köti meg. Az I. és a II. domén is kölcsönhatásba lép a nukleotid cserélő faktor eEF1B α -val, ami lehetővé teszi a fehérje inaktív (GDP-kötő) formából aktív (GTP-kötő) formába kerülését. Így az elongációs faktor alkalmassá válik új aa-tRNS molekula kötésére, elkezdődhet újra az elongációs ciklus (Andersen 2000; Andersen, 2001; Andersen és Nyborg, 2001). A fehérjének két izoformája ismert. Az eEF1A1 fehérje minden emlős szövetben kifejeződik, kivéve a vázizomban és a szívben ahol a vele 92%-os homológiát mutató eEF1A2 fehérje expresszálódik. Az eEF1A1 fehérjét az *EEF1A1* gén kódolja, míg az eEF1A2 fehérje kódolásáért az *EEF1A2* gén felel (Soares és Abbott, 2013).

Az eEF1A részt vesz a citoszkeleton átrendeződésének szabályozásában (Shiina és mtsai., 1994; Pittman és mtsai., 2009), továbbá szerepet játszik a fehérjék proteoszóma mediált lebontásában is (Chuang és mtsai., 2005). Az apoptózisban és a daganatok kialakulásában betöltött szerepét mind a két izoforma esetében leírták (Panasyuk és mtsai., 2008; Negrutskii és mtsai., 2012; Pellegrino és mtsai., 2014; Schulz és mtsai., 2014). A fehérje részt vesz továbbá a vírusok (például a nyugat-nílusi lázat okozó vírus, dohány mozaik vírus) replikációjában (Dreher, 1999; Davis és mtsai., 2007; Li és mtsai., 2009) (4.8. ábra).



4.8. ábra. Az *eEF1A1* fehérje funkciói. (Mateyak és Kinzy, 2010)

A nukleáris exportban betöltött szerepéről irodalmi adatokból ismert, hogy az exportin-5 (Exp5) fehérje exportálja az *eEF1A1*-t és a tRNS-t a sejtmagból, továbbá, hogy az *eEF1A* fehérje elősegíti a SNAG (Snail/GFI) domént tartalmazó fehérjék nukleáris exportját az Exp5-aminoacil-tRNS komplex közreműködésével (Calado és mtsai., 2002; Bohnsack és mtsai., 2002; Mingot és mtsai., 2013). Ugyanakkor leírták, hogy az *eEF1A1* a nukleáris envelop (sejtmagi burkolat) 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 találunk egy rövid peptidszakaszt (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 (Khacho és mtsai., 2008a; Khacho és mtsai., 2008b).

4.4. A merlin fehérje

A merlin (moezin-ezrin-radixin like protein) (Trofatter és mtsai., 1993), más néven schwannomin (Rouleau és mtsai., 1993), vagy neurofibromin 2 egy tumorsuppresszor fehérje (Gusella és mtsai., 1999), mely funkciójának elvesztése úgynevezett neurofibromatózis 2 betegség kialakulásához vezethet, ami – elsősorban – az idegrendszeret érintő tumorkok (leggyakrabban akusztikus neuromák) kialakulását okozza (Scoles és mtsai., 2006). Emellett a fehérje funkcióvesztését figyelték meg malignus mezoteliómában (Cheng és mtsai., 1999; Bott és mtsai., 2011) és más szolid tumorokban is (Bianchi et al., 1994; Rustgi és mtsai., 1995; Lau

és mtsai., 2008; Dalgliesh és mtsai., 2010). A merlin egy evolúciósan konzerválódott fehérje, a *Drosophilában* expresszáldó merlin több mint 50%-os, míg az egérben kifejeződő merlin 98%-os homológiát mutat a humán fehérjével (Golovkina és mtsai., 2005; McClatchey, 2013). Minden felnőtt, és számos embrionális humán szövetben kifejeződik, de legnagyobb mennyiségben a Schwann-sejtekben, a meningeális sejtekben és az idegekben expresszáldó (Pecina-Slaus, 2013).

A 22-es kromoszóma rövid karjának 12-es régiójában (22q12) 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 (Morrow és Shevde, 2012). 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 (Zoch és mtsai., 2015). 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 (Cooper és Giancotti, 2014). A merlin nagyfokú szekvencia homológiát mutat a citoszkeleton-asszociált ERM fehérjékkel, melyekkel együtt a Band 4.1 fehérjecsaldba sorolják (Shimizu és mtsai., 2002). 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 (**4.9. ábra**) (Sun és mtsai., 2002).



4.9. ábra. A merlin domén szerkezete. A számok az aminosav szekvencia pozíciót jelölik. A FERM domén esetében A, B és C-vel az aldomének láthatók.

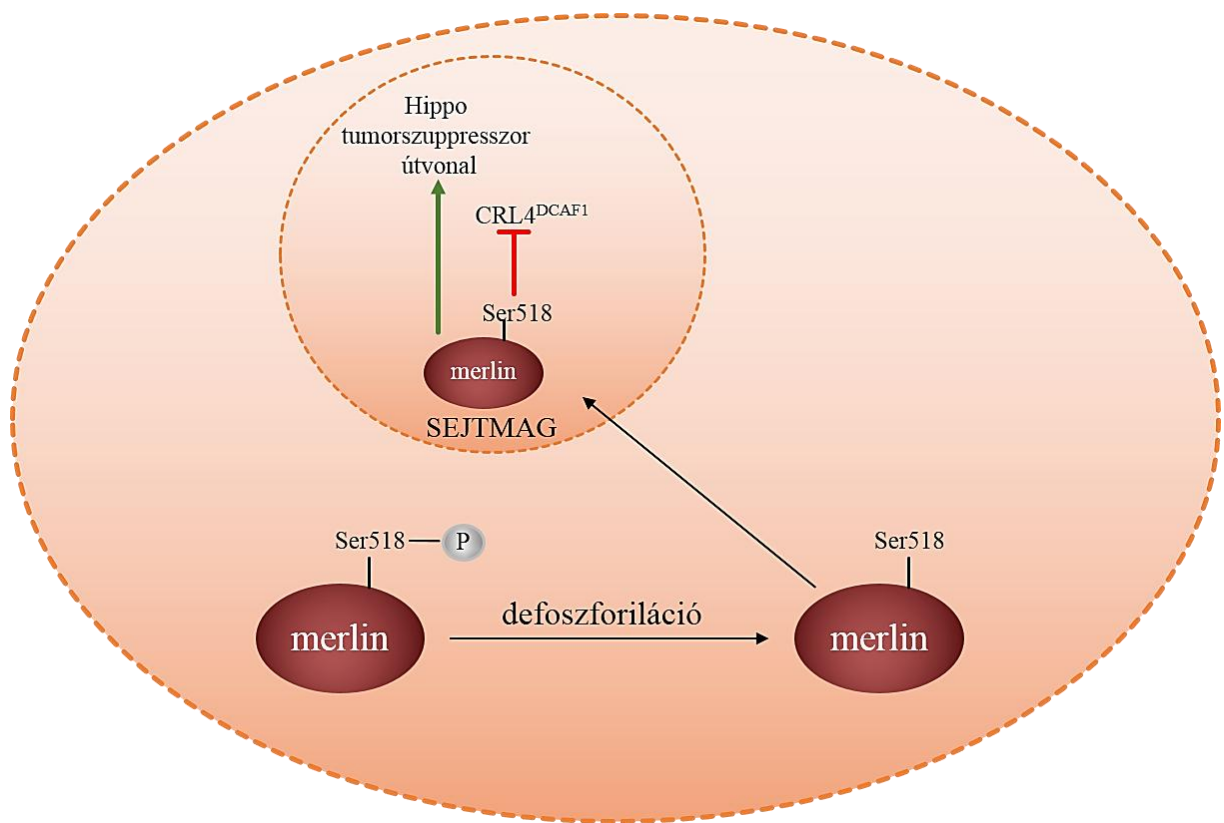
Az ERM fehérjétől eltérően a merlin nem tartalmaz aktin-kötő domént, de az ERM fehérjéken keresztül közvetve kapcsolódni tud az aktin-citoszkeletonhoz (Stamenkovic és mtsai., 2010). A merlin FERM doménje további három aldoménra osztható. A FERM és C-terminális domének között intramolekuláris kölcsönhatás alakulhat ki (Sherman és mtsai., 1997; Gonzalez-Agosti és mtsai., 1999; Sun és mtsai., 2002).

A merlinnek fontos szerepe van a sejtek túlnövekedésének gátlásában. Konfluens sejtek esetében kölcsönhatásba lép különböző membrán asszociált fehérjékkel, és ezzel szabályozni tudja a sejtmembrán mikrodomének szerveződését (McCartney és Fehon, 1996). A merlin

intracelluláris lokalizációja központi jelentőségű a sejten belüli más fehérjékkel kialakított kapcsolatok tekintetében is, ami a merlin-deficiens szövetekben zavart szenved (Gladden és mtsai., 2016). Leírták, hogy a működőképes merlin a sejtek citoskeletonja mellett figyelhető meg (Sainio és mtsai., 1997). *Drosophilában* a merlin fehérje a sejtek plazmamembránjában dúsul (McCartney és Fehon, 1996; LaJeunesse és mtsai., 1998). Ez a megfigyelés jól korrelál azokkal az eredményekkel, amelyek a merlinnek a konfluens sejtek adherens kapcsolatainak létrehozásáról és a lamelliopódiumokban, valamint sejt migrációban szerepet játszó membrán fodrokban történő lokalizációjáról szólnak (Gonzalez-Agosti és mtsai., 1996; Scherer és Gutmann, 1996; Shaw és mtsai., 1998; Lallemand és mtsai., 2003; Okada és mtsai., 2005).

A merlin kölcsönhatásba lép több plazmamembrán-, vagy a mellett lokalizálódó fehérjével: az ERM fehérjékkel, az NHERF1 fehérjével, a CD44-gyel, továbbá az adherens sejtkapcsolatokban szerepet játszó α -kateninnel, illetve a szoros sejtkapcsolatokban megtalálható angiomotinnal (Sainio és mtsai., 1997; Murthy és mtsai., 1998; Morrison és mtsai., 2001; Gladden és mtsai., 2010; Yi és mtsai., 2011). 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 (**4.10. ábra**) (McClatchey és Fehon, 2009; Gladden és mtsai., 2010; Li és mtsai., 2010; Cooper és Giancotti, 2014).

A merlin Ser518 oldalláncon defoszforilált formában aktív, vagyis képes ellátni tumorszuppresszív funkcióját. A p21 aktivált kináz (PAK) vagy protein kináz A (PKA) általi foszforilációja következtében azonban a fehérje tumorszuppresszív funkciója szempontjából inaktívvá válik. A merlin szerkezetét és funkcióját is befolyásoló poszttranszlációs módosítások jól ismertek az irodalomban. Az ezeket szabályozó intra-, illetve extracelluláris jelekről az ismereteink egyre bővülnek (Cooper és Giancotti, 2014). Leírták, hogy a Cdc42 és a Rac aktiválja PAK-ot a receptor tirozin kináz és integrinek által közvetített promotogén jelátviteli útvonalon. Az aktivált PAK közvetlenül foszforilálja 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 (Bretscher és mtsai., 2002; Li és mtsai., 2010).



4.10. ábra. A merlin tumorszuppresszor funkciót betöltő szerepének sematikus ábrája. A merlin fehérje foszforilációja hatással van a fehérje sejtben belüli lokalizációjára. A merlin defoszforilált formában a sejtmagban aktiválni tudja a Hippo tumor szuppresszor útvonalat illetve gátolja a CRL4^{DCAF1} E3 ubiquitin ligázt.

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.

5. 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. A TIMAP fiziológias funkcióiáról a legtöbb ismeretünket a kölcsönható partnereinek megismerése által nyertünk, melyek alapján az endotél sejtek élettani szerepéről megszerzett 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 fehérjékkal 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.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Anyagok

6.1.1. Reagensek és vegyszerek

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

6.1.2. Pufferek, oldatok és táptalajok

1xPBS: 20 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4

1xTAE: 4 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 0,114% (m/V) ecetsav, pH 8,5

1xTBS: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5

1xTBST: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% (m/V) Tween-20, pH 7,5

2xYT táptalaj: 16 g/l, 10 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl, pH 7,0

5xSDS mintapuffer: 50% (m/V) glicerin, 10% (M/V) SDS, 310 mM Tris, 0,01% (m/V)

brómfenokék, 5% (m/V) 2-ME frissen használat előtt hozzáadva

IP puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 1% (m/V)

NP-40, proteáz inhibitor koktél frissen használat előtt hozzáadva

SDS-PAGE futtató puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,25 mM SDS

Transzfer puffer: 120 mM Tris-HCl, 40 mM glicin, 20% (m/V) metanol

Lízis puffer: 50 mM Tris (pH 7,5), 0,1% (m/V) Tween-20, 0,2% (m/V) 2-ME, proteáz inhibitor

koktél frissen használat előtt az oldathoz adva

Coomassie Blue gélfesték: 50% (m/V) metanol, 10% (m/V) ecetsav, 1 g/l Coomassie Brilliant

Blue R-250

Blue Silver Coomassie gélfesték: 10 % (m/V) foszforsav, 10% (m/V) ammónium-szulfát, 20%

(m/V) metanol, 1,2 g/l Coomassie Blue G-250

Gélmosó folyadék: 7% (m/V) jégecet, 12% (m/V) metanol

LB (Luria-Bertani) táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0

LB (Luria-Bertani) agar táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 1,5% agar,

pH 7,0

SOC táptalaj: 20 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 5 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄, 20 mM glükóz frissen használat előtt hozzáadva.

6.1.3. Baktériumtörzsek

Escherichia coli **BL21 (DE3)** fehérje expresszióra alkalmas sejtvonala (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Escherichia coli **JM109** klónozásra alkalmas sejtvonala (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

6.1.4. Oligonukleotidok

Az oligonukleotidokat az Integrated DNA Technologies (Coraville, IA, USA) cégtől szereztük be (**6.1. táblázat**).

6.1. táblázat. A kísérletek során alkalmazott oligonukleotidok és vektorok

Konstrukt/gén	Primerek szekvenciája	Vektor	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
TIMAP 1-257 (pGEX)	F: 5' – TGGGATCCATGGCCAGTCACGTGGACC – 3' R: 5' – TTACTCGAGTCACACATCCACACGCACTCCATG – 3'	pGEX- 4T-3	55,4 59,1	65,8 65,6
TIMAP 1-257 G252A (pGEX)	F: 5' – TGGGATCCATGGCCAGTCACGTGGACC – 3' R: 5' – TTACTCGAGTCACACATCCACACGCACTGCATG – 3'	pGEX- 4T-3	55,4 59,1	65,8 65,6
eEF1A1	F: 5' – ATGGATCCATGGGAAAGGAGAAGACCCA – 3' R: 5' – TTACTCGAGTCATTTAGCCTTCTGAGCTTTC – 3'	pGEX- 4T-2	51,8 51,1	61,4 60,4
TIMAP 1-257 (pCMV)	F: 5' – TTGAATTCTTATGGCCAGTCACGTGGAC – 3' R: 5' – TTACTCGAGTCACACATCCACACGCACTCCATG – 3'	pCMV- Myc	53,8 59,1	59,9 65,6
TIMAP 1-257 G252A (pCMV)	F: 5' – TTGAATTCTTATGGCCAGTCACGTGGAC – 3' R: 5' – TTACTCGAGTCACACATCCACACGCACTGCATG – 3'	pCMV- Myc	53,8 59,1	59,9 65,6
merlin	F: 5' – TTGAATTCCCATGGCCGGGGCCATCG – 3' R: 5' – TTCAGTCGACCTAGAGCTCTT – 3'	pGEX- 4T-2	59,4 49,5	64,3 52,4
merlin FERM domén	F: 5' – TTGAATTCCCATGGCCGGGGCCATCG – 3' R: 5' – TTAGTCGACTCACCTTCTCCTCATAAATAGATCAT – 3'	pGEX- 4T-2	59,4 53,2	64,3 60,9
merlin α-helikális domén	F: 5' – TCAAGGATCCATGAAAGCCGATTCTTTGGAAGTTCA – 3' R: 5' – TAAGTCGACTCAAGACAGGCTGTCA – 3'	pGEX- 4T-2	54,8 50,1	63,3 57,7
merlin C-terminális domén	F: 5' – ATTGGATCCATGTTCGACTTCAAAGATACTGACA – 3' R: 5' – TTCAGTCGACCTAGAGCTCTT – 3'	pGEX- 4T-2	52,8 49,5	60,8 52,4
merlin (1-es és 2-es izoforma*)	F: 5' – ACG TAC CCG CCC ATG AAC CCA ATT C – 3' R: 5' – TCT TCA CTC AGC TGG GGA AAG TTC T – 3'	-	-	61 57,7

Az endonukleázok felismerési szekvenciái dőlt betűvel vannak jelölve. F: forward, R: reverse.

*a merlin 1-es és 2-es izoformájának felsokszorozására használt primerpár.

Tm1: endonukleázok szekvenciája és az extra nukleotidok nélkül számolt olvadáspont.

Tm2: teljes hosszúságú primer olvadáspontja.

6.2. Módszerek

6.2.1. Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakció (PCR)

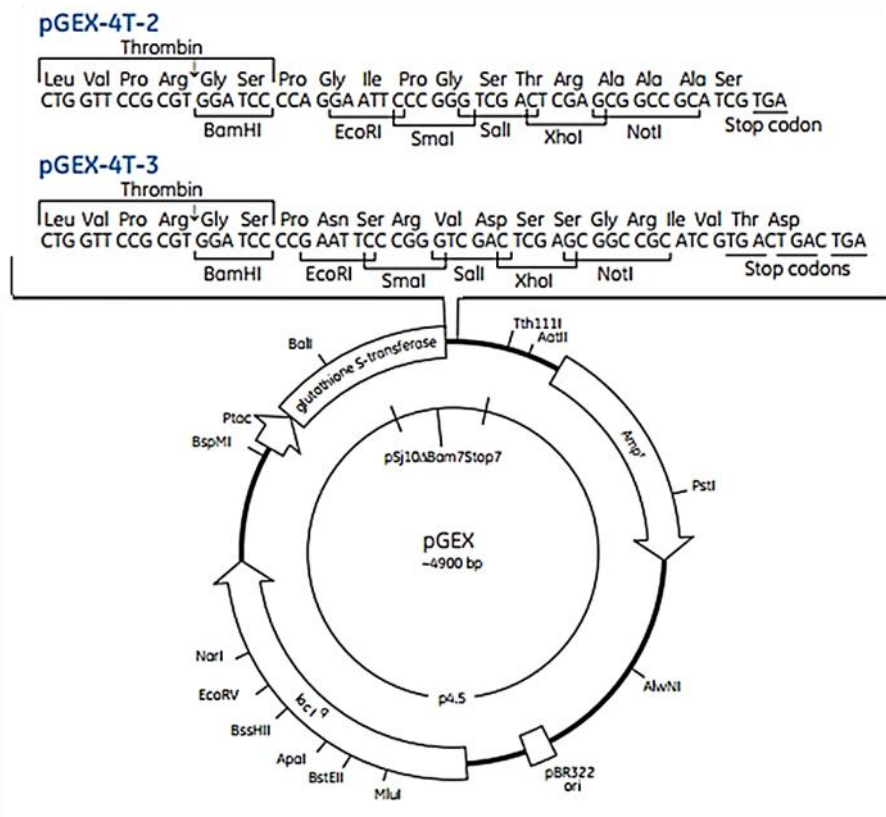
Az endotél sejtekből totál RNS-t izoláltunk ZR RNA MicroPrep™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) kit segítségével a gyártó utasítása szerint. A reverz transzkripció során a reakcióközeg az alábbiakat tartalmazta: 2 µg RNS, 1 µl oligo dT15 és nukleáz-mentes víz úgy, hogy a reakcióközeg végtérfogatát 10 µl-re egészítse ki. A reakciólegyet 5 percig 70°C-os vízfürdőben inkubáltuk, majd 2 percre jégre helyeztük. Ezután kiegészítettük 5 µl RT pufferrel, 1,25 µl 5 mM-os dNTP-vel, 1 µl M-LVR RT-vel és 7 µl nukleáz-mentes vízzel. 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd az elkészült cDNS-t -20°C-on tároltuk.

A PCR reakciókban elsőként denaturáltuk a DNS-t 98°C-on 1 percig. Ezt követte egy 5 ciklusos szakasz: denaturáció 98°C-on 10 másodpercig, hibridizáció a **6.1. táblázatban** megadott T_m °C-ok alapján meghatározott hőmérsékleten 10 másodpercig, és szintézis 72°C-on 15-30 másodpercig. Ezt követte egy 30 ciklusból álló szakasz, ahol a hőmérséklet és az időtartam megegyezett, kivéve a hibridizációs lépést ahol a T_m értékek alapján számolt hőmérsékletet alkalmaztunk. Ezután a mintákat 1 percig a szintézis hőmérsékletén tartottuk. Az 5 ciklusos lépés azért volt szükséges, mert a primerek 5' végén a szekvencia harmada nem komplementer a templáthoz, ugyanis ez tartalmazza a klónozáshoz szükséges restriktions hasító helyek szekvenciáját. A PCR reakciókhoz Phire® vagy Phusion® DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) használtunk.

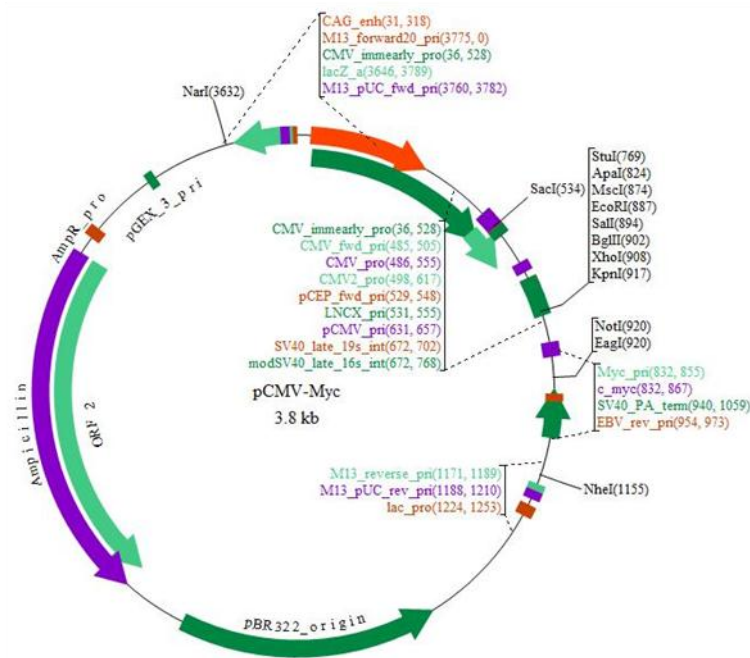
6.2.2. Plazmidok, klónozás

Klónozás során pGEX-4T-2, pGEX-4T-3 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) bakteriális és pCMV-Myc (Thermo Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) emlős expresszióra alkalmas vektorokat használtunk (**6.1. ábra**).

A



B



6.1. ábra. A pGEX (A) és a pCMV-Myc (B) vektor térképe.

Forrás: A: <http://studylib.net/doc/8234585/pgex-vectors--gst-gene-fusion-system>, és

B: <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pCMV-Myc.htm>

6.2.2.1. Agaróz gélelektroforézis, a DNS kinyerése agaróz gélből

A DNS darabok elválasztására 1-1,2%-os agaróz gélt használtunk. Az agarózt 1xTAE pufferben oldottuk fel melegítéssel. A DNS láthatóvá tételére GelRed nukleinsav festéket (Biotium Inc., Fremont, CA, USA) használtunk. A kívágni kívánt fragmenteket UV asztal (Hoefler 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.

6.2.2.2. Restriktációs emésztés

A restriktációs hasításhoz a Thermo Fischer Scientific cég (Waltham, MA, USA) FastDigest enzimeit (BamHI: G⁺GATCC, EcoRI: G⁺AATTC, NotI: GC⁺GGCCGC, Sall: G⁺TCGAC, XhoI: C⁻TCGAG) használtuk a gyártó előírásai szerint, 10X FastDigest puffert alkalmazva. Az enzimek mennyisége nem haladta meg a teljes reakcióközeg 10%-át.

6.2.2.3. Ligálás

Ligálás során 1:3 = vektor:inzeret 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.

6.2.2.4. Kompetens sejtek előállítása

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.

6.2.2.5. Transzformálás

A plazmidokat, vagy a ligálási elegyet 100 µl jégen felolvasztott kompetens sejthez adtuk, és 20 percen át jégen inkubáltuk, 45 másodpercig 42°C-os hősokkot 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 100 µg/ml ampicillin antibiotikum tartalmú LB-agar táptalajra szélesztettük. A konstruktot nem tartalmazó kontroll mintát antibiotikumot tartalmazó, és ampicillin mentes LB-agar táptalajra is szélesztettük. A lemezeket 16 órán át 37°C-os termosztátban inkubáltuk.

6.2.2.6. Plazmid preparálás

A plazmid DNS-t tartalmazó baktérium tenyészet egyetlen telepét 3 ml 100 µg/ml ampicillin 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.

6.2.2.7. 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 végezték a laboratóriumban beállított protokoll szerint.

6.2.3. A fúziós fehérjék előállítása

A GST-, vagy c-myc-címkével fuzionált 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 ráztattuk ($OD_{600} = 0,5-0,6$). A rekombináns fehérjék expresszióját a **6.2. táblázatban** összefoglaltak szerint végeztük minden esetben 3 órán keresztül. Ezt követően a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (5000 g, 10 perc, 4°C). A pelletet 1xPBS-sel mostuk, mikrocentrifuga csövekbe szétosztottuk, ismét centrifugáltuk, majd a pelletet -70°C-ra helyeztük.

6.2. táblázat. A fúziós fehérjék előállítására használt IPTG koncentrációk és hőmérsékletek

Konstrukt	IPTG koncentráció	Hőmérséklet (°C)
TIMAP wt-pGEX-4T-3	1 mM	25°C
TIMAP 1-165-pGEX-4T-3	1 mM	25°C
TIMAP 1-290-pGEX-4T-3	1 mM	25°C
TIMAP 165-290-pGEX-4T-3	1 mM	25°C
TIMAP 291-567-pGEX-4T-3	1 mM	25°C
TIMAP 1-257-pGEX-4T-3	0,1 mM	37°C
TIMAP 1-257 G252A-pGEX-4T-3	0,1 mM	37°C
eEF1A1-pGEX-4T-2	1 mM	25°C
merlin-pGEX-4T-2	0,1 mM	25°C
merlin FERM domén-pGEX-4T-2	0,1 mM	25°C
merlin α -helikális domén-pGEX-4T-2	0,1 mM	25°C
merlin C-terminális domén-pGEX-4T-2	0,1 mM	37°C
TIMAP 1-257-pCMV-Myc	0,1 mM	37°C
TIMAP 1-257 G252A-pCMV-Myc	0,1 mM	37°C

6.2.4. Az endotél sejtek tenyésztése

A kísérletekhez használt marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC, Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cell) a 8. passzáznál vásároltuk meg az American Type Culture Collection-től (Manassas, VA, USA; sejtvonala: CCL 209) és a 15-22 passzálas között használtuk fel. A sejteket 10% hőinaktivált FBS, 1% nem-esszenciális aminosav és 1% Napiruvát tartalmú, Minimal Essential Médiumban (MEM) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) tenyésztettük 37°C-on 5% szén-dioxidot tartalmazó atmoszférában.

6.2.5. Immunprecipitáció

Immunprecipitációs kísérletekhez az endotél sejteket 100 mm átmérőjű sejtenyészítő 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 Branson Sonifer (AMS Materials, LLC, Jacksonville, FL, USA) homogenizáló készülékkel 30% duty cycle és 3-as output control beállítások mellett, majd a mintákat 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.

6.2.6. Endotél sejtek transzfecciója

6.2.6.1. Endotél sejtek transzfecciója plazmidokkal

BPAE sejtek transzfecciója pCMV-Myc TIMAP 1-257 vad típusú (wt), vagy pCMV-Myc 1-257 TIMAP G252A mutáns (mu) plazmiddal történt Lipofectamine 2000 transzfecció 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.

6.2.6.2. Endotél sejtek transzfecciója siRNS-sel

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 transzfecció reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történt a gyártó utasításai szerint. A komplexet inkubációja szobahőmérsékleten történt. A sejtekkel történő inkubáció szérumentes 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.

6.2.7. 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 (6.3. táblázat). 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 szoftverrel került felhasználásra. A másodlagos antitestek nem-specifikus kötődése kontroll kísérletekben lett ellenőrizve.

6.3. táblázat. A fluoreszcens festéshez alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek jellemzése

	Antitest	Gyártó	Izotípus	Hígítás
Elsődleges antitestek	anti-foszfo-merlin (Ser518)	Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA	nyúl IgG	1:100
	anti-CD31 (PECAM1)	Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA	egér IgG	1:100
	anti-c-myc	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	egér IgG	1:100
Másodlagos antitestek	Alexa Fluor® 488 konjugált	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	nyúl IgG	1:500
	Alexa Fluor® 594 konjugált	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	egér IgG	1:500

6.2.8. Szubcelluláris frakcionálás

BPAE sejtek szubcelluláris frakcionálása ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), 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.

6.2.9. Affinitás kromatográfia és *in vitro* GST pull down assay

A GST címkével fuzionált fehérjéket tartalmazó baktérium sejteket 600 μ l hideg lízis pufferben tártuk fel, jeges vízben szonikáltuk 1 percig Branson Sonifer (AMS Materials, LLC, Jacksonville, FL, USA) homogenizáló készülékkel 30% duty cycle és 3-as output control beállítások mellett, majd a sejtlyázatot 12000 g-n, 20 percig, 4°C-on centrifugáltuk.

A GST-TIMAP 1-257 és GST-TIMAP 1-257 G525A overexpresszált fehérjék feltárása hagyományos lízis pufferrel történő feltárással nem volt hatékony, ezért ezeket a konstruktokat tartalmazó baktérium sejtek feltárása eltért: 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 (Park, 2011).

Minden feltárt fehérje esetében a felülúszóhoz 50 μ l 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 μ l hideg lízis pufferben felkapartuk, 4°C-on, 20 másodpercig szonikáltuk Branson Sonifer (AMS Materials, LLC, Jacksonville, FL, USA) homogenizáló készülékkel 30% duty cycle és 3-as output control beállítások mellett, 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.

6.2.10. SDS-PAGE és Western blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását 10-12%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel Bio-Rad készüléken végeztük. A molekulatömegek azonosítására előfestett fehérje létrát használtunk (ProSieve™ Protein Colored Marker, Lonza, Bazel, Svájc). 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 **(6.4. táblázat)**.

Ezután a membránt a megfelelő peroxidázzal jelzett másodlagos antitesttel (anti-egér/anti-nyúl IgG, HRP-konjugált másodlagos antitest, CellSignaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az egyes lépések között a membránt 1XTBST-vel mostuk 2 x 5 percig, illetve 1XTBS-sel 1 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.

6.4. táblázat. A Western blot kísérleteinkhez használt elsődleges antitestek jellemzése

Antitest	Gyártó	Izotípus	Hígítás
aktin (H-300)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	nyúl IgG	1:2000
β-tubulin	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA	egér IgG	1:2000
CD31 (PECAM1)	Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA	egér IgG	1:1000
c-myc	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA	egér IgG	1:2000
eEF1A1	Abgent Inc., San Diego, CA, USA	nyúl IgG	1:1000
eEF1α	BD Transduction Laboratories™, Heidelberg, Németország	egér IgG	1:1000
foszfo-merlin (Ser518)	Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA	nyúl IgG	1:1000
lamin A/C (H-110)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	nyúl IgG	1:2000
merlin (D1D8)	Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA	nyúl IgG	1:1000
MYPT1	A DE ÁOK OVI* Miozin Foszfátáz Laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre (Lontay és mtsai., 2004)	nyúl IgG	1:1000
PP1c delta	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA	nyúl IgG	1:1000
PPP1R16B (TIMAP)	Abgent Inc., San Diego, CA, USA	nyúl IgG	1:1000

*DE ÁOK OVI: Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézet

6.2.11. Az endotél sejtek specifikus foszfatázgátló kezelése

BPAE sejteket specifikus foszfatázgátlókkal kezeltünk a **6.5. táblázatban** összefoglaltak szerint. Kontrollként (vehikulum) DMSO kezelést alkalmaztunk. A kezeléseket követően a sejteket lízis pufferben felkapartuk, majd 1xSDS mintapufferben főztük 10 percig.

6.5. táblázat. A BPAE sejtek foszfatáz enzimeinek gátlására felhasznált gátlók jellemzése

Foszfatázgátló neve	Alkalmazott végkoncentráció	Ebben a koncentrációban a gátlószer specificitása	Idő (min)
Tautomycin (TM)	1 μ M	PP1	30
Okadánsav (OS)	5 nM	PP2A	30
Ciklosporin A (CsA)	2 μ M	PP2B	30

6.2.12. LC-MS/MS analízis

A GST pull down kísérletet követően a fehérjéket SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd Blue Silver oldattal festettük (Candiano, 2004). 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.

6.2.13. Statisztikai analízis

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, a normalizálás részletei a vonatkozó, 7.2.6. fejezetben olvasható.

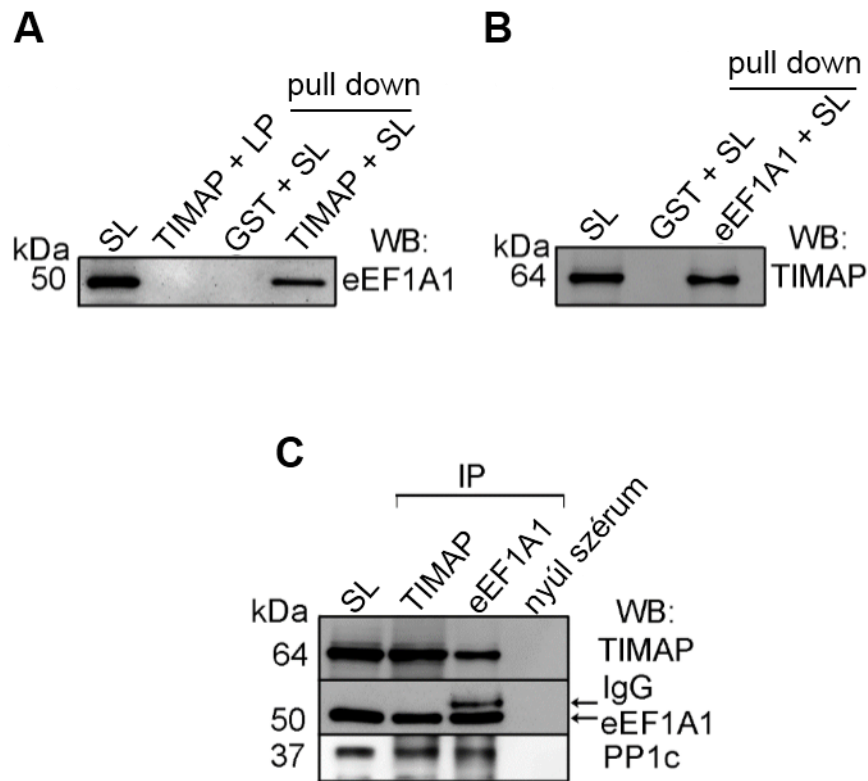
7. EREDMÉNYEK

7.1. A TIMAP új kölcsönható partnerének azonosítása

7.1.1. Az eEF1A1 a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben

A TIMAP fehérje endotél sejtekben magas szinten expresszálódik más sejtípusokhoz képest (Csortos és mtsai., 2008), a szerepéről azonban még mindig kevés információ áll rendelkezésünkre, bár az elmúlt években több TIMAP kölcsönható partnert is azonosítottunk (Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011; Boratkó és mtsai., 2013; Boratkó és mtsai., 2016). Munkánk során további TIMAP kölcsönható partnerek keresését végeztük endotél sejtekben. Ehhez GST címkével ellátott overexpresszált TIMAP fehérjét glutation Sepharose 4B gyantához immobilizáltunk, majd a kikötődött fehérjét BPAE sejtlyizátummal inkubáltuk. Kontrollként két féle mintát használtunk: az első kontroll minta esetében immobilizált GST fehérjéhez BPAE sejtlyizátumot adtunk, a második kontroll minta esetében pedig a bakteriálisan overexpresszált TIMAP fehérjét immobilizáltuk glutation 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 sejtlyizátummal 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 A 1 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 sejtlyizátummal inkubáltuk. Kontrollként olyan mintát használtunk ahol immobilizált GST fehérjét BPAE sejtlyizátummal inkubáltunk. A TIMAP és az eEF1A1 fehérjék kölcsönhatását a pull down minták Western blot analízisével megerősítettük specifikus TIMAP, illetve eEF1A1 elleni antitestekkel (7.1. ábra A és B).

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 (Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011), 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 (7.1. ábra C).



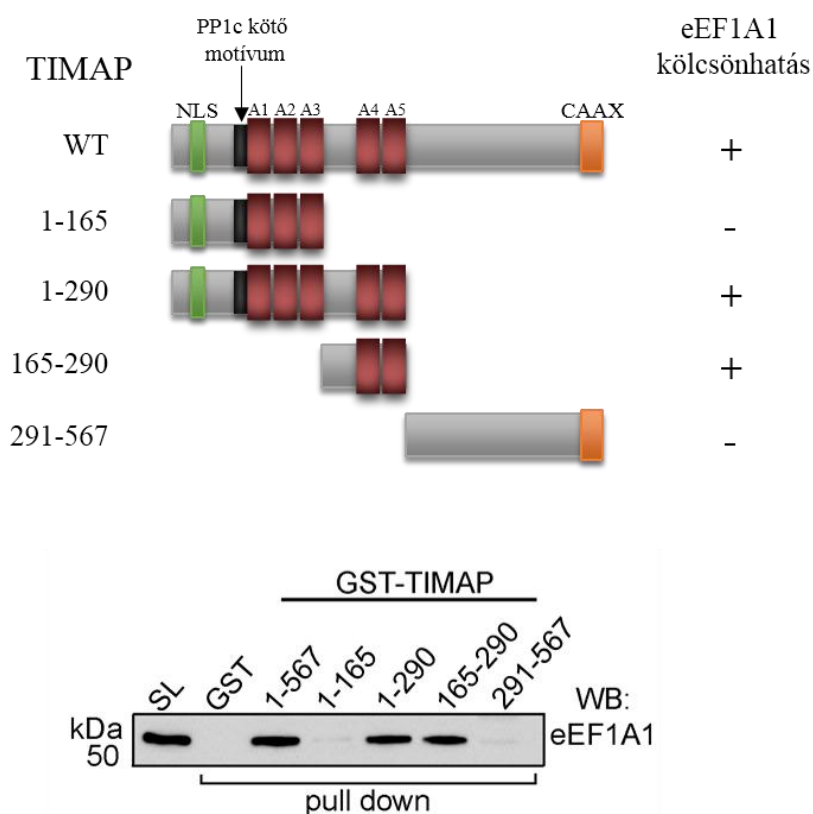
7.1. ábra. Az *eEF1A1* és *TIMAP* kölcsönhatásának detektálása endotél sejtekben. Bakteriálisan overexpresszált glutation-S-transzferáz (GST) és GST címkével ellátott vad típusú *TIMAP* (A) vagy GST címkével ellátott *eEF1A1* (B) fehérjéket glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltunk az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A szükséges mosási lépéseket követően az immobilizált fehérjéket BPAEC lizátummal (SL), vagy lízis pufferral (LP) inkubáltuk (pull down). A nem kötődött fehérjéket mostuk, majd a gyantát 1xSDS mintapufferben főztük. Az endotél sejtlyizátumban és eluátumokban a fehérjéket Western blottal vizsgáltuk specifikus *TIMAP* és *eEF1A1* antitestekkel az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint (C). Az endogén fehérjék kölcsönhatását BPAE sejtlyizátumok specifikus *eEF1A1*, vagy *TIMAP* elleni antitesttel készült immunprecipitátumában Western blottal vizsgáltuk specifikus *TIMAP*, *eEF1A1* illetve *PP1c* elleni antitestek felhasználásával. Kontrollként nyúl IgG-t tartalmazó szérumot használtunk. Az *eEF1A1* immunprecipitátumában körülbelül 55 kDa-nál megjelenő extra sáv az IgG nehéz láncának felel meg. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

7.1.2. A *TIMAP* és az *eEF1A1* 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 a GST-*TIMAP* különböző rövidített formáit használtuk pull down kísérletben. Az alkalmazott GST-*TIMAP* fragmentumokat a **7.2. ábra** mutatja be. 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 (7.2. ábra alsó rész).

Irodalmi adatokból ismert, hogy az eEF1A1 fehérje szerepet játszik több fehérje sejtmagi exportjában, és hogy ehhez, valamint eEF1A1 mediált nukleáris exportjukban szükséges egy úgynevezett TD-NEM motívum megléte (Khacho és mtsai., 2008a; Khacho és mtsai., 2008b). A TIMAP szekvenciájának gondos elemzését követően megállapítottuk, hogy a 250-260 aminosav közötti szakaszon található egy olyan szekvencia részlet, ami a TIMAP TD-NEM szerű motívumának felelhet meg (TD-NEM: **DxGxxDxxL**, TIMAP: ²⁵⁰**DHGVRVDVKDW**₂₆₀).



7.2. ábra. A TIMAP fehérje kölcsönható régióinak feltérképezése. GST fehérjét, rekombináns teljes hosszúságú GST-TIMAP (1-567 aminosav) fehérjét, vagy további GST-TIMAP fragmentumokat, (az ábra felső részén sematikusán ábrázolva), glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltunk, és BPAE sejtlizátummal inkubáltuk (pull down). A teljes sejtlizátumot (SL) és a pull down eluátumokat Western blottal vizsgáltuk, specifikus eEF1A1 elleni antitesttel. Az ábrán három független kísérlet reprezentatív eredménye látható.

7.1.3. A TD-NEM motívum szerepe a TIMAP és az eEF1A1 kölcsönhatásában és a TIMAP nukleáris exportjában

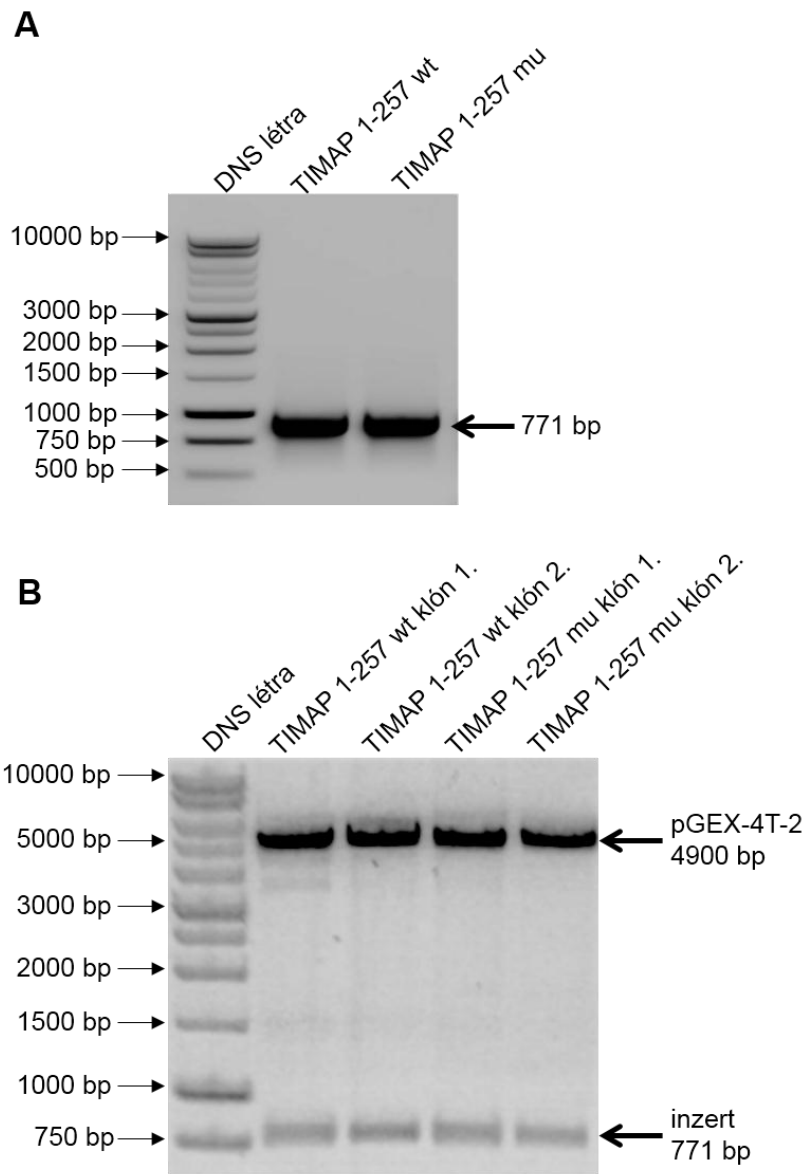
7.1.3.1. A TIMAP TD-NEM szerű motívumát kódoló vad típusú és mutáns rövidített rekombináns fehérjék előállítása

Az előző alfejezetben leírtak tükrében felmerült a kérdés, hogy a TIMAP TD-NEM szerű motívumának szerepe van-e az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásában. 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 (Khacho és mtsai., 2008a).

Mi is megvizsgáltuk ennek a mutációnak a hatását az eEF1A1 és TIMAP kölcsönhatásában. Ezért 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 vad típusú és mutáns TIMAP-ot (1-257 aminosav) kódoló felsokszorozott PCR terméket agaróz gélen futattuk (**7.3. ábra A**), majd a fragmentumoknak megfelelő méretnél jelentkező sávokat kivágtuk és tisztítottuk. A tisztított DNS-t pGEX-4T-3 vektorba szubklónoztuk, majd a rekombináns plazmidokat restrikciós emésztéssel ellenőriztük (**7.3. ábra B**). Mind a vad típusú, mind a mutáns plazmid esetében két-két klónt vizsgáltunk, és ahogy az ábrán látható, mind a négy klón tartalmazta az inzertet. További munkánkhoz a vad típus esetében a 2. klónt, míg a mutáns plazmid esetében az 1. klónt használtuk.

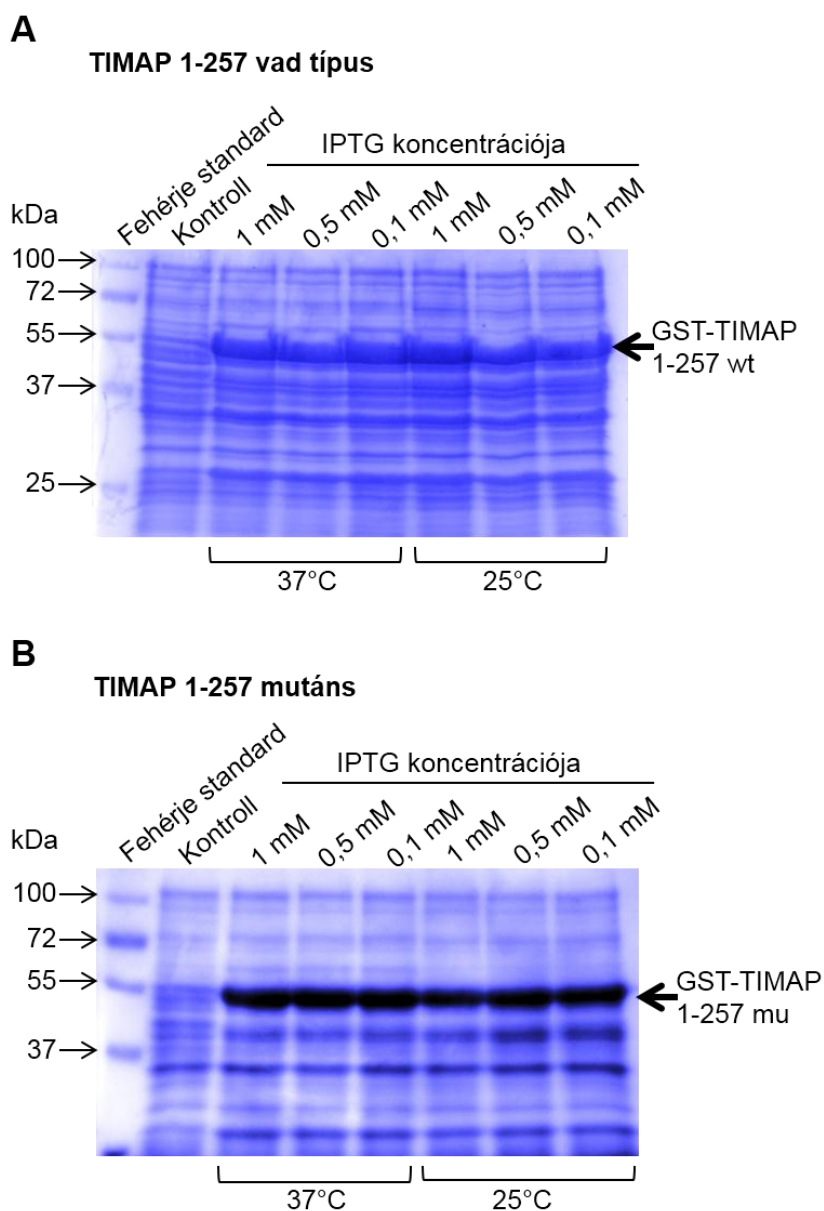
A plazmidokat szekvenálással ellenőriztük. A TIMAP 1-257 vad típusú plazmid esetében mutáció nélkül sikerült beépítenünk az inzertet a vektorba, míg a TIMAP 1-257 G252A mutáns plazmid esetében a 252. aminosav esetében alanint kódoló szekvenciát kaptunk.



7.3. ábra. A vad típusú (wt) és mutáns (mu) TIMAP 1-257 konstruktok előállítás.
A: A TIMAP 1-257 (wt és mu) PCR-rel felszorzottuk, majd 1%-os agaróz gélen futtatuk. A 771 bp méretű terméket UV asztal fölött kivágtuk a gélből, majd tisztítottuk. **B:** A rekombináns plazmidok két-két klónját restriktív emésztéssel ellenőriztük BamHI és XhoI restriktív endonukleázok felhasználásával. 5000 bp környékén a pGEX-4T-3 vektor jelent meg (4900 bp), míg 750 bp fölött az inzerteknek megfelelő méretetnél kaptunk sávot (TIMAP 1-257 wt és mu inzert: 771 bp).

A sikeresen létrehozott plazmidokat *E. coli* BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltuk, és a fehérje termeltetést az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint optimalizáltuk. 55 kDa méretnél minden kondíció esetében egy erős sáv jelent meg a kontroll, IPTG-vel nem indukált mintához képest, ami a GST címkével ellátott vad típusú TIMAP 1-257 (**7.4. ábra A**) és mutáns TIMAP 1-257 G252A (**7.4. ábra B**) fehérje méretének felel meg.

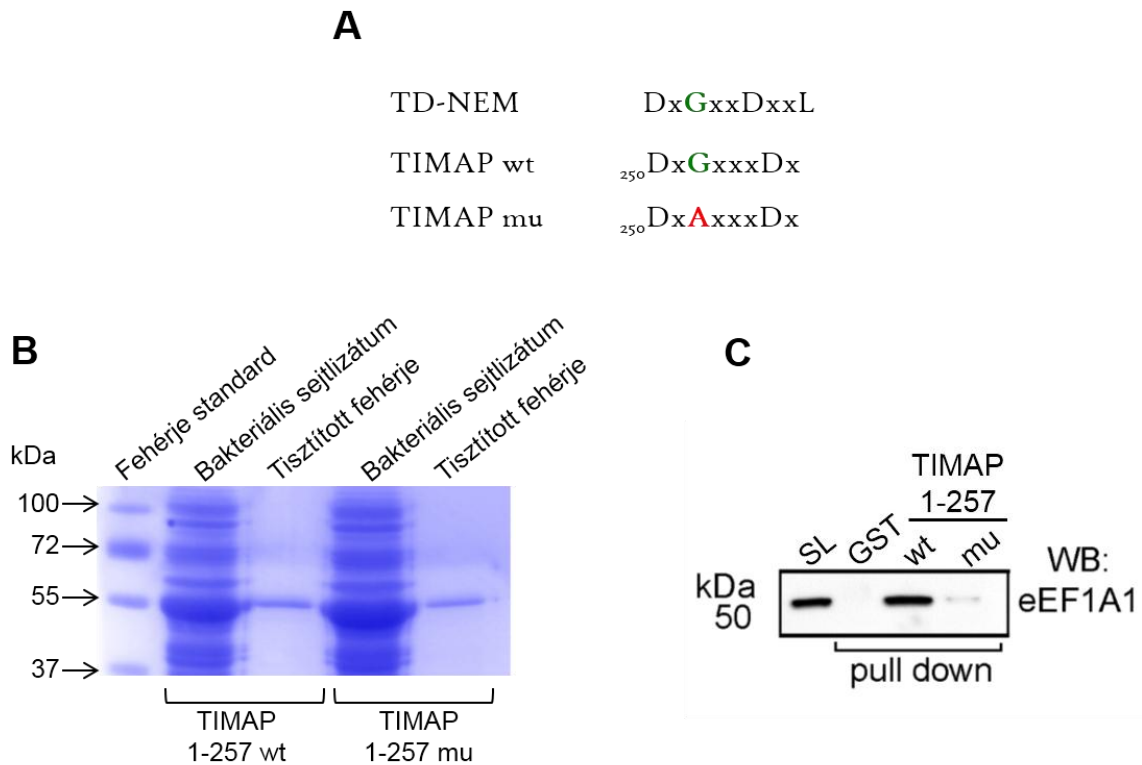
A későbbi kísérleteinkhez mindkét konstrukt esetében a 0,1 mM IPTG koncentrációt és a 37°C-os hőmérsékletet használtuk.



7.4. ábra. Vad típusú TIMAP 1-257 és mutáns TIMAP 1-257 G252A bakteriális fehérje expresszió optimalizálása. **A:** GST-TIMAP 1-257 wt optimalizálásólása. **B:** GST-TIMAP 1-257 wt optimalizálásólása. A fehérje termeltetés optimalizálása 37°C illetve 25°C-on, többféle IPTG koncentráció felhasználásával történt mindkét konstrukt esetében. A kontroll mintához nem adtunk IPTG-t. A bakteriális teljes sejtlizátumokat 1xSDS mintapufferben főztük, majd 10%-os poliakrilamid gélen futtattuk. A fehérjesávokat Coomassie Blue festéssel tettük láthatóvá. wt: vad típus, mu: mutáns.

7.1.3.2. A TIMAP TD-NEM szerű motívuma esszenciális az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásban

Az overexpresszált fehérjék baktérium sejtekből történő kinyerését szarkozilt tartalmazó lízis pufferben végeztük az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint. A lízis puffer szarkozillal történő kiegészítésére azért volt szükség, mivel a hagyományos lízis pufferrel történő sejteltávolítás nem volt sikeres. A szarkozilos feltárást követően az overexpresszált vad típusú és mutáns TIMAP 1-257 fragmentumokat affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A tisztítás előtti teljes sejtlyúzátumban 55 kDa-nál jelentkező erős sáv a GST-TIMAP vad típusú 1-257, illetve mutáns TIMAP 1-257 G252A overexpresszált fehérjének felel meg. A gyantáról eluált minták esetében egy sávot detektáltunk a GST-TIMAP vad típusú és mutáns overexpresszált fehérjének megfelelően, ami a tisztítás sikerességét bizonyítja (**7.5. ábra A**). 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 (**7.5. ábra B**). 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.



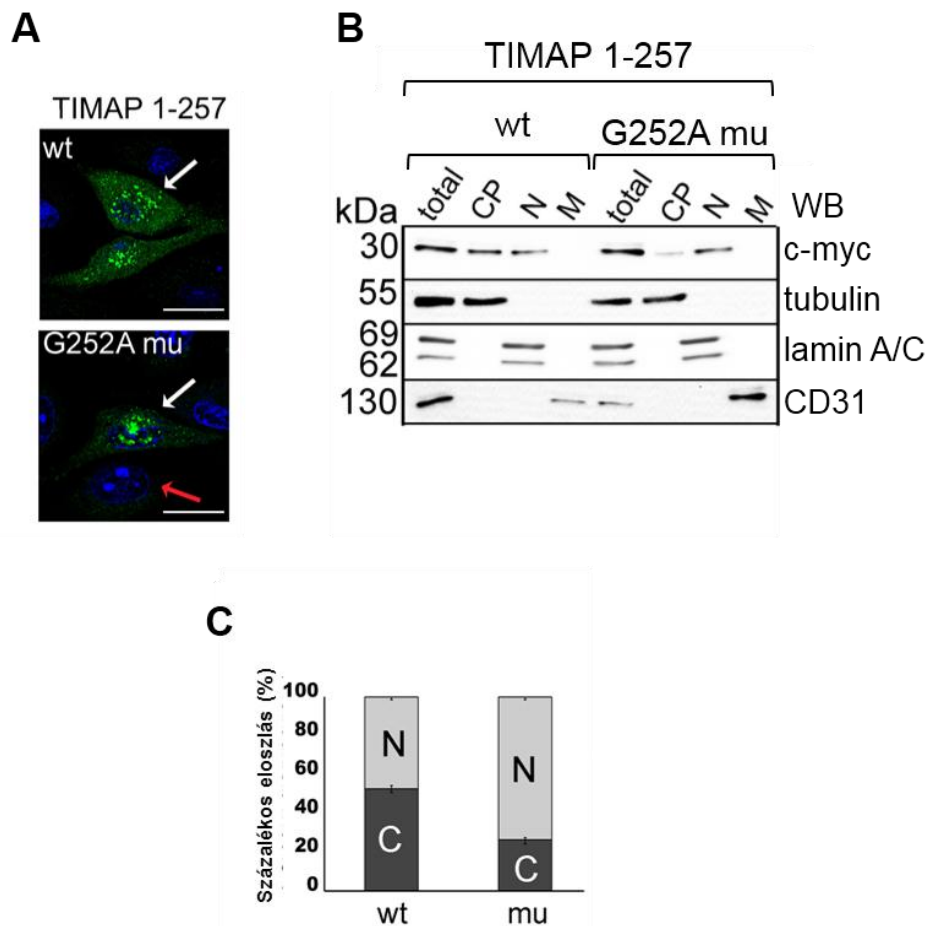
7.5. ábra. A TIMAP TD-NEM szerű motívumának szerepe az eEF1A1 fehérjével való kölcsönhatásában. **A:** Vad típusú TIMAP 1-257 és mutáns TIMAP 1-257 G252A fragmentumokat affinitás kromatográfiával tisztítottunk. A baktériumsejteket hideg lízis pufferben szonikáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszóból mintát vettünk, és 1xSDS mintapufferben főztük (Bakteriális sejtlizátum). A felülúszóhoz mosott glutation Sepharose 4B gyantát adtuk, majd a mintákat 4°C-on forgattuk. A gyantáról a fehérjét főzéssel eluáltuk (Tisztított fehérje). A bakteriális sejtlizátumot és a tisztított fehérjét tartalmazó mintákat SDS-PAGE-t követő Coomassie Blue festéssel vizsgáltuk. **B:** A vad típusú TIMAP 1-257 és mutáns TIMAP 1-257 G252A fehérjéket glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk. A szükséges mosási lépéseket követően az immobilizált fehérjéket BPAE lizátummal (SL) inkubáltuk (pull down). Kontrollként (GST) olyan mintát használtunk ahol GST fehérjét immobilizáltunk, majd a kikötődött fehérjét BPAE sejtlizátummal inkubáltuk. A nem kötődött fehérjéket mostuk, majd a gyantát 1xSDS mintapufferben főztük. Az endotél sejtlizátumban és eluátumokban a fehérjéket Western blottal vizsgáltuk specifikus eEF1A1 elleni antitesttel. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

Ezután, a vad típusú és a G252A mutáns TIMAP 1-257 aminosavát kódoló szekvenciát pCMV-Myc vektorba szubklónoztuk és emlős sejtben 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 (**7.6. ábra A**).

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 (**7.6. ábra B**).

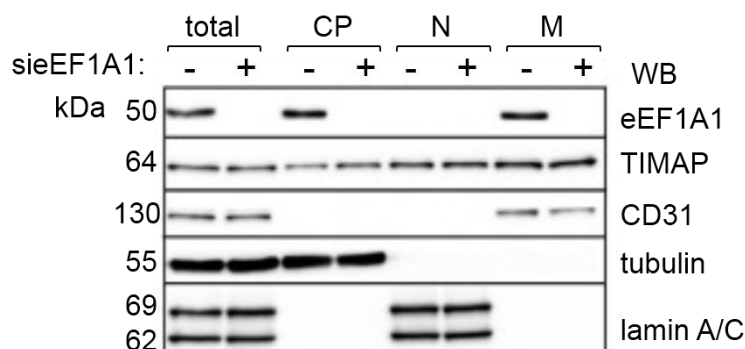
A TIMAP membránba történő lokalizációjának előfeltétele a fehérje prenilációja (Cao és mtsai., 2002). Mivel a rövidített plazmidok nem kódolták a TIMAP prenilációs motívumát, így – ahogy az várható volt – sem a rövidített vad típusú, sem a rövidített G252A mutáns fehérje nem volt detektálható a plazmamembránban. A vad típusú és a mutáns rövidített fehérjék citoplazmatikus/sejtmagi eloszlását megvizsgálta azt 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 (**7.6. ábra C**).



7.6. ábra. pCMV-Myc-TIMAP 1-257 vad típusú (wt) és G252A mutáns (mu) fehérje lokalizációja endotél sejtekben. *A:* BPAC sejtek pCMV-Myc-TIMAP 1-257 wt és pCMV-Myc-TIMAP 1-257 G252A mu plazmiddal lettek transzfektálva. A fehérjék detektálására immunfluoreszcens festéssel történt specifikus c-myc elleni elsődleges antitest és Alexa 488-cal konjugált másodlagos antitest felhasználásával (zöld). A sejtmag festésére TO-PRO-3 Iodide (kék) festéssel történt. Az ábrán a fehér nyíl a rövidített fehérjékkel overexpresszált sejteket mutatja, míg a piros nyíl a kontroll (a rövidített fehérjét nem expresszáló) sejtekre mutat. A másodlagos antitestek nem-specifikus kötődése kontroll kísérletben lett ellenőrizve, mely eredmények a disszertációban nem szerepelnek. Lépték: 20 μ m. *B:* pCMV-Myc-TIMAP wt és pCMV-myc-TIMAP G252A mu plazmiddal transzfektált BPAC sejtekből szubcelluláris frakcionálással citoplazma (CP), sejtmag (N) és membrán (M) frakciók lettek izolálva, majd a totál sejtlizátum és a frakciók Western blot kísérletben lettek vizsgálva specifikus c-myc elleni antitesttel. Citoplazma markerként specifikus β -tubulin elleni, sejtmag markerként specifikus lamin A/C elleni, membrán markerként specifikus CD31 elleni antitest lett felhasználva. *C:* a Western blottal nyert sávok kvantitatív elemzését követően meghatározásra került a rövidített fehérjék citoplazmatikus (C) és sejtmagi (N) eloszlása. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja. (Dr. Boratkó Anita eredménye)

7.1.3.3. 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 sejteket voltak használva, amelyek nem-specifikus siRNS kezelést kaptak. A csendesített sejtekből citoplazma, sejtmag és membrán frakciók lettek 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 markert, specifikus β -tubulin elleni antitestet, mint citoplazma, és specifikus lamin A/C elleni antitestet, mint sejtmag markert használtak (7.7. ábra). 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 minták citoplazma és membrán frakcióiban lehetett detektálni, hanem az eEF1A1 depletált minták citoplazma és plazmamembrán frakcióiban is.



7.7. ábra. Az eEF1A1 fehérje csendesítésének hatása a TIMAP sejten belüli lokalizációjára. Specifikus siRNS-sel és nem-specifikus siRNS-sel kezelt BPAE sejtek szubcelluláris frakcionálását követően az eEF1A1 és a TIMAP lokalizációja specifikus eEF1A1 és TIMAP elleni antitestekkel lett vizsgálva. Citoplazma (CP) markerként specifikus tubulin, sejtmag (N) markerként specifikus lamin A/C, membrán (M) markerként specifikus CD31 elleni antitestek lettek felhasználva. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja. (Dr. Boratkó Anita eredménye)

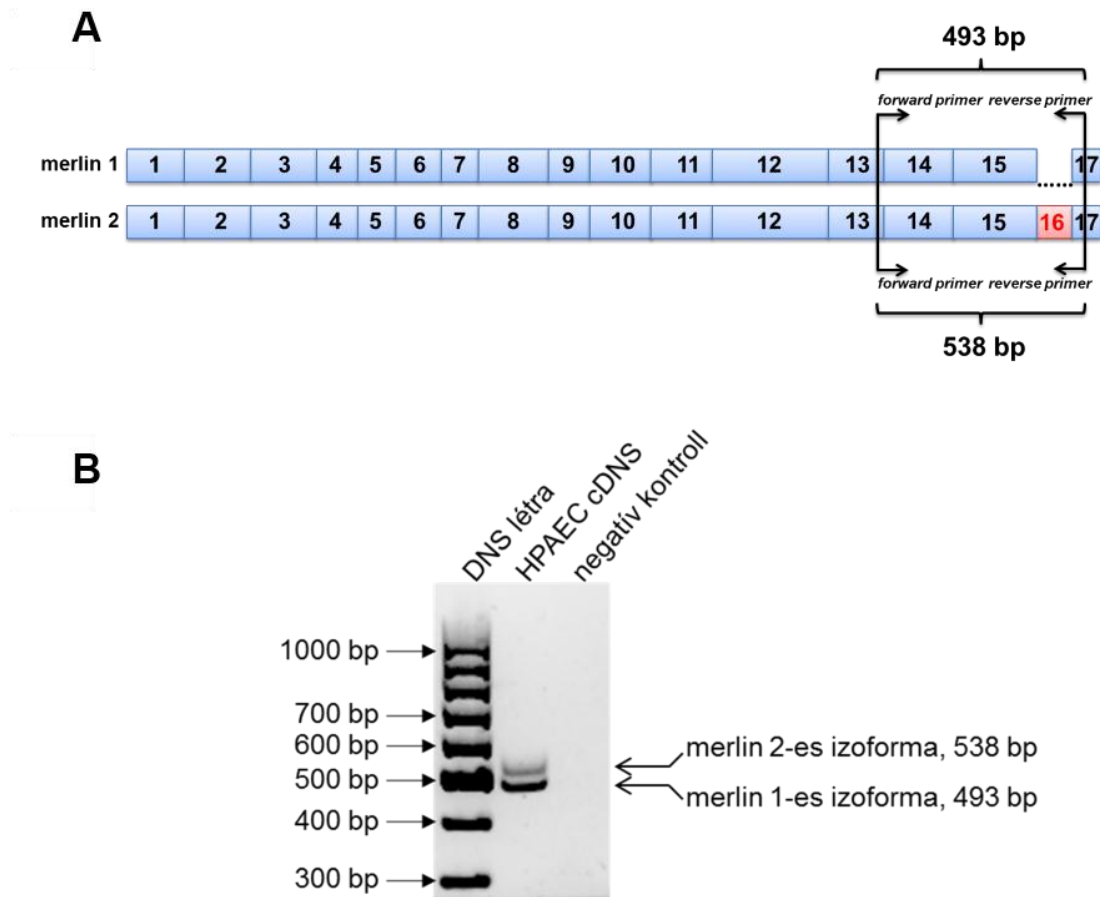
7.2. A merlin és a PP1c-TIMAP komplex fehérje kölcsönhatásának vizsgálata

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 (Csortos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011, Boratkó és Csortos 2017). Az ERM fehérjékkel rokon merlin Ser518 oldalláncon történő PAK/PKA mediált foszforilációja a fehérjében bekövetkező konformáció változással jár és befolyásolja a fehérje biológiai aktivitását (Cooper és mtsai., 2014). A defoszforilációt végző foszfatáz enzimet/enzimeket endotél sejtekben még nem vizsgálták.

7.2.1. 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, forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>).

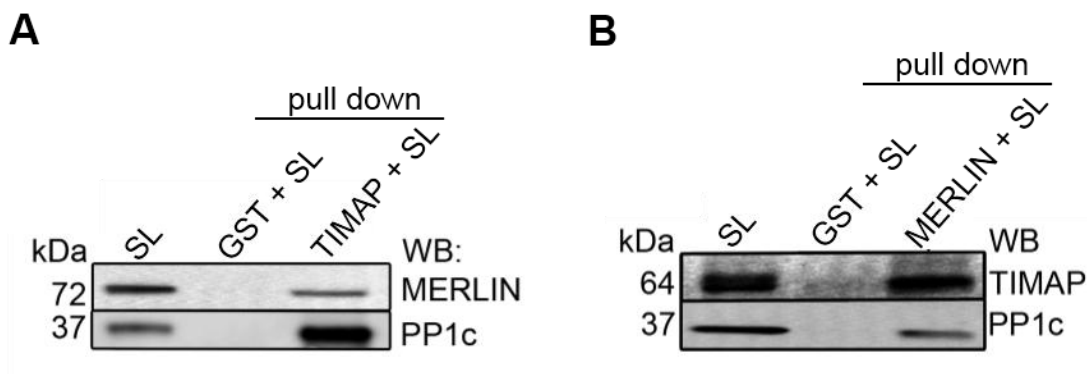
Megvizsgáltuk, hogy az endotél sejtekben az 1-es, vagy a 2-es, esetleg mindkét merlin izoforma kifejeződik-e. Ennek eldöntésére olyan primerpárt terveztünk, amely a 2-es izoformában kifejeződő 16-os exont közrefogja (**7.8. ábra A**). A 16-os exon megléte/hiánya következtében egy 45 bp-nyi különbség 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 (**7.8. ábra B**), 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 felsokszoroztuk és pGEX-4T-2 vektorba klónoztuk. A plazmidot szekvenálással ellenőriztük.



7.8.  bra. Merlin 1-es és 2-es izoformák vizsgálata endotél sejtekben. **A:** HPAEC-ben kifejeződő a merlin szekvenciájára specifikus primerpárt terveztünk, ami közrefogja a csak a 2-es izoformában expresszálódó 16-os exont. **B:** a PCR termék agaróz gélelektroforézis képe 1,2%-os gélen futtatva. Templátként HPAEC cDNS-t alkalmaztunk. A negatív kontroll esetében HPAEC cDNS helyett nukleáz mentes vizet tartalmazott a reakció. A DNS láthatóvá tételére GelRed DNS festéket használtunk. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

7.2.2. A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának detektálása

A merlin és a PP1c-TIMAP komplex közötti kölcsönhatást pull down kísérlettel vizsgáltuk. Az overexpresszált merlin, illetve TIMAP fehb rj ket glutation Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd BPAE sejtlizátummal inkubáltuk. A totál sejtliz tumat és a pull down mintákat Western blottal vizsgáltuk specifikus merlin, TIMAP, illetve PP1c elleni antitestek felhasználásával. Eredményeink alapján a merlin és a TIMAP kölcsönhatnak egymással endotél sejtekben, továbbá a pull down mintákban a PP1c enzim jelenlétét is detektálni tudtuk. (7.9.  bra A  s B).

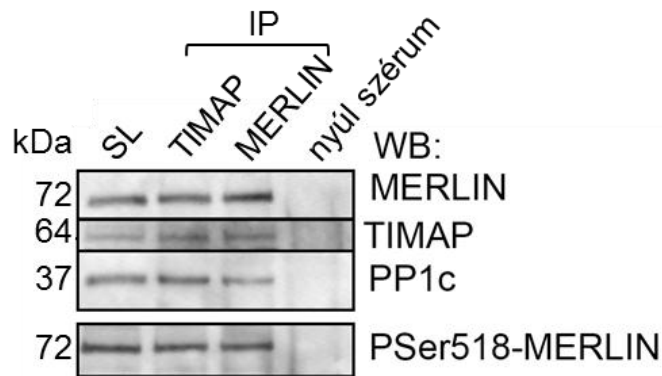


7.9. ábra. A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának detektálása. Bakteriálisan overexpresszált glutation S-transzferáz (GST) és GST címkével jelölt vad típusú TIMAP (A), vagy GST címkével jelölt merlin (B) fehérjét glutation Sepharose gyantán immobilizáltunk. A mosási lépéseket követően a gyantát marha tüdő artéria endotél sejtizátummal (SL) inkubáltuk (pull down). Az aspecifikusan kötődött fehérjéket mostuk, majd a specifikusan kötődött fehérjéket 1xSDS mintapufferben való főzéssel eluáltuk. A sejtizátumot és a pull down mintákat Western blottal vizsgáltuk specifikus merlin, TIMAP és PP1c elleni antitestekkel. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

7.2.3. Az endogén fehérjék kölcsönhatásának detektálása

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 (7.10. ábra).



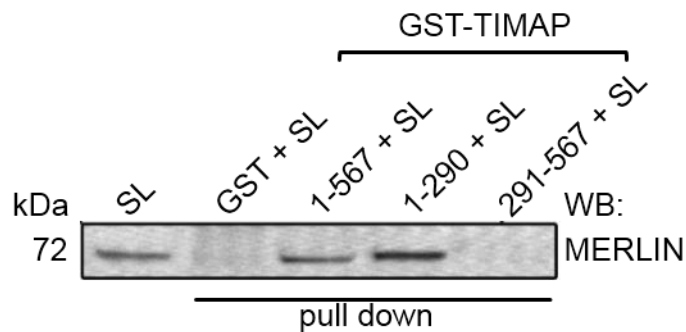
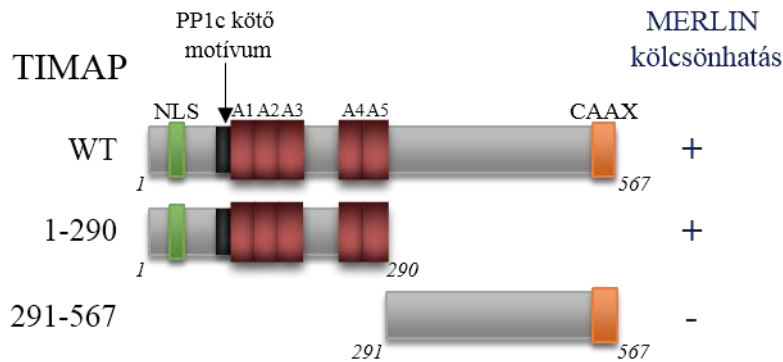
7.10. ábra. *A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának detektálása endotél sejtekben. BPAE sejtlyizátumok merlin, vagy TIMAP elleni specifikus antitesttel készült immunprecipitátumát Western blottal vizsgáltuk anti-merlin, -TIMAP, -PP1c vagy foszfo-Ser518-merlin elleni antitestekkel. Kontrollként nyúl IgG-t tartalmazó szérumot használtunk. Az ábra három kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.*

7.2.4. A merlin és a PP1c-TIMAP komplex kölcsönhatásának feltérképezése

7.2.4.1. A kölcsönhatás vizsgálata a TIMAP oldaláról

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, amelyek sematikusán ábrázolva a **7.11. ábrán** láthatóak.

A teljes hosszúságú, valamint az N-terminális és 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 (**7.11. ábra alsó rész**). 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 régiója érintett. A fehérjének ez a régiója 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.



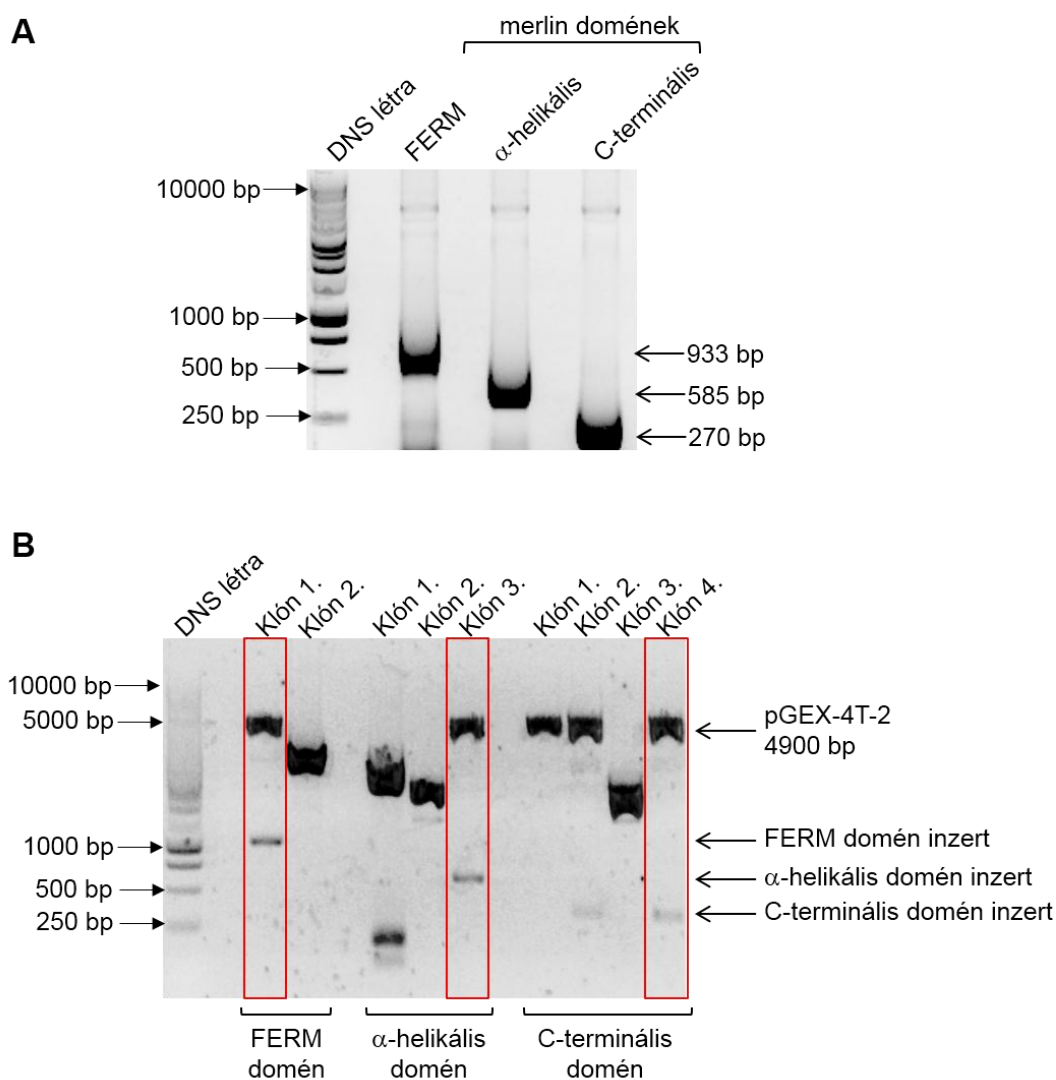
7.11. ábra. A TIMAP merlin kölcsönhatás feltérképezése. A fehérjék kölcsönható régióinak feltérképezésére vad típusú és rövidített TIMAP fehérjékkel pull down kísérletet végeztünk. A sejtlyázátumot (SL) és a pull down mintákat Western blottal vizsgáltuk specifikus merlin elleni antitesttel. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

7.2.4.2. A kölcsönhatás vizsgálata a merlin oldaláról

A merlin fehérje három doménből áll, melyek az FERM, az α -helikális, valamint a C-terminális domén (Sun és mtsai., 2002). Annak eldöntésére, hogy a merlin melyik doménje(i) kötik a PP1c-TIMAP komplexet merlin FERM domén, α -helikális domén és C-terminális domén rekombináns fehérjét 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. A merlin egyes doménjeire specifikus primereket terveztünk, majd PCR reakcióban a DNS-t felszorzottuk. A PCR termékeket agaróz gélen futtatuk (7.12. ábra A), majd a sávokat kivágtuk és tisztítottuk az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint. A tisztított terméket pGEX-4T-2 vektorba szubklónoztuk, majd a rekombináns plazmidokat restriktív emésztéssel ellenőriztük (7.12. ábra B). A FERM domén esetében két, az α -helikális domén esetében három, míg a C-terminális domén esetében négy klónt vizsgáltunk. Az ábrán látható, hogy mindhárom domén esetében volt legalább egy klón, ami tartalmazta az inzertet. Az ábrán

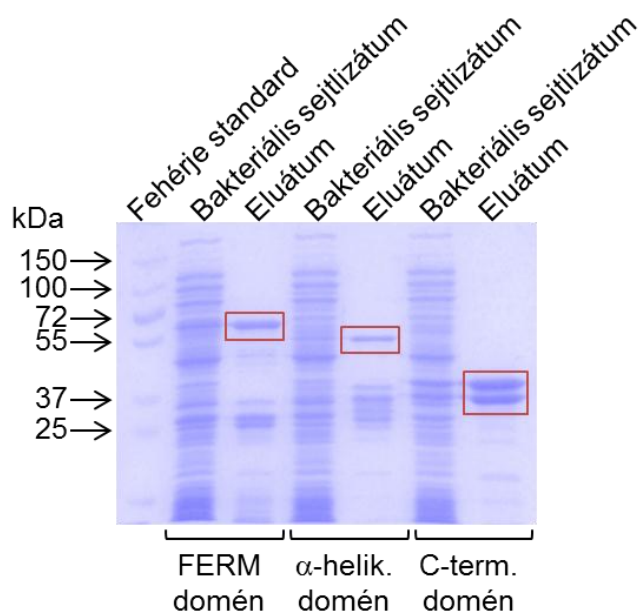
pirossal bekeretezve láthatóak azok a klónok melyeket a további kísérletekhez felhasználtunk. A plazmidokat szekvenálással ellenőriztük.



7.12. ábra. A merlin FERM, α-helikális és C-terminális domén konstruktok előállítás. **A:** a merlin FERM, α-helikális és C-terminális doménjeit kódoló DNS szakaszokat PCR-rel felszorzottuk, majd 1%-os agaróz gélen futtatuk. A PCR termékeket UV asztal fölött kivágtuk a gélből, majd tisztítottuk az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint. **B:** a három domén rekombináns klónjait restriktív emésztéssel ellenőriztük *EcoRI* és *SalI* (FERM domén esetében), illetve *BamHI* és *SalI* (α-helikális és C-terminális domén esetében) restriktív endonukleázok felhasználásával. 5000 bp környékén a pGEX-4T-2 vektor jelent meg (4900 bp).

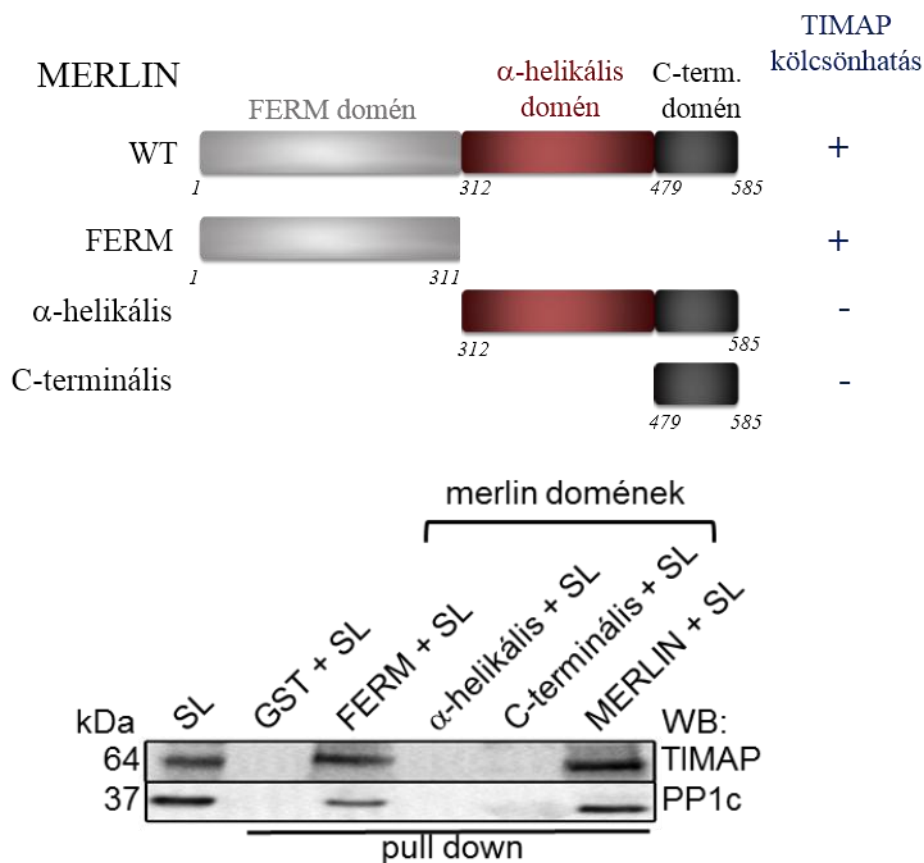
A sikeresen létrehozott plazmidokat *E. coli* BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltuk, majd a fehérje termelést az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírtak szerint optimalizáltuk. A későbbi kísérletekhez mindhárom domén esetében 0,1 mM IPTG koncentrációt valamint, a FERM domén és az α -helikális domén esetében 25°C-ot, míg a C-terminális domén esetében 37°C-ot alkalmaztunk.

Az overexpresszált FERM, α -helikális és C-terminális domén fragmentumokat affinitás kromatográfiával tisztítottuk az *Anyagok és módszerek* fejezetben leírt módon. A gyantáról eluált minták poliakrilamid gélen történő futtatását és Coomassie Blue festését követően mindhárom domén esetében a várt méretnél (GST-FERM domén: 60 kDa, GST- α -helikális domén: 47 kDa, GST-C-terminális domén: 37 kDa) kaptunk egy erős sávot, ami az affinitás kromatográfia sikerességét jelzi. A C-terminális domén tisztítása esetében a dupla sáv feltehetően proteolitikus degradáció eredménye (**7.13. ábra**). A bekeretezett sávok alatt jelentkező halványabb sávok a fehérje degradációjára utalnak.



7.13. ábra Merlin domének tisztítása affinitás kromatográfiával. A merlin FERM, α -helikális és C-terminális domén fragmentumokat affinitás kromatográfiával tisztítottunk. A baktériumsejteket hideg lízis pufferben feltártuk, szonikáltuk, centrifugáltuk, majd a felülúszóból mintát vettünk, és 1xSDS mintapufferben főztük (Bakteriális sejtlizátum). A felülúszóhoz mosott glutation Sepharose 4B gyantát adtuk, majd a mintákat 4°C-on forgattuk. A gyantáról a fehérjét főzéssel eluáltuk (Eluátum). A bakteriális sejtlizátumot és az eluátumot SDS-PAGE-t követő Coomassie Blue festéssel vizsgáltuk.

Ezt követően a GST-vel fúzionált FERM, α -helikális és C-terminális merlin domén fragmentumokat pull down kísérletben vizsgáltuk (a merlin domén szerkezete sematikus ábrázolva a **7.14. ábra felső részén**). Eredményeink alapján a merlin a FERM-doménjén keresztül kötődik a TIMAP fehérjéhez, továbbá ezen a doménon kapcsolódik a PP1c-hez is (**7.14. ábra alsó rész**).

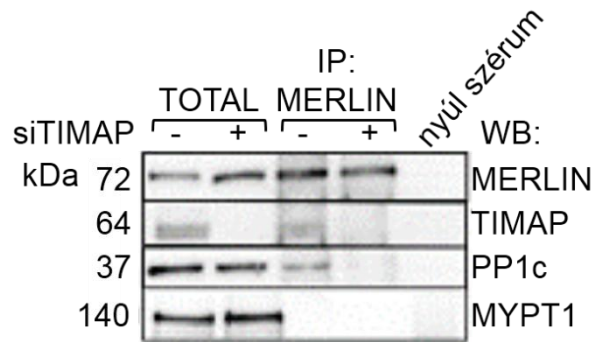
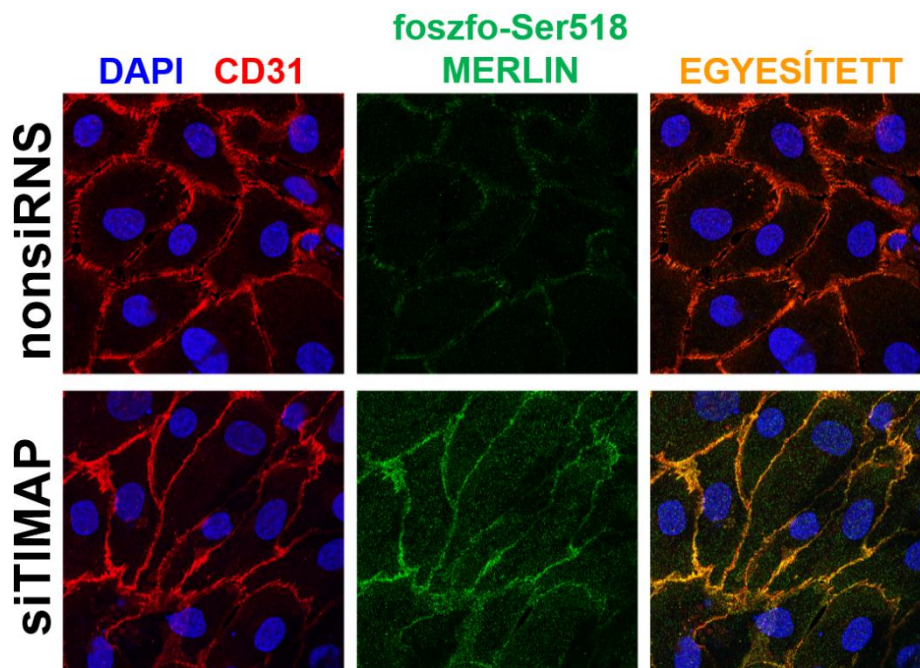


7.14. ábra. A TIMAP és a merlin domének kölcsönhatásának feltérképezése. A fehérjék kölcsönható régióinak feltérképezésére vad típusú és rövidített merlin fehérjékkel pull down kísérletet végeztünk. A BPAE sejtlizátumot (SL), és a pull down mintákat Western blottal vizsgáltuk specifikus TIMAP és PP1c elleni antitestekkel. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

7.2.5. A TIMAP csendesítés hatásának vizsgálata a merlin és 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 sejtizátum és az immunprecipitátumok Western blot kísérletben lettek vizsgálva a TIMAP depletált minták és a nem-specifikus siRNS-sel kezelt minták esetében is (**7.15. ábra A**). A fehérje csendesítése sikeresnek bizonyult, ahogy az a 7.15. ábrán is látható a TIMAP specifikus siRNS-sel kezelt sejtizátumban 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 (nonsi-RNS) kezelt sejtekhez képest (**7.15. ábra B**).

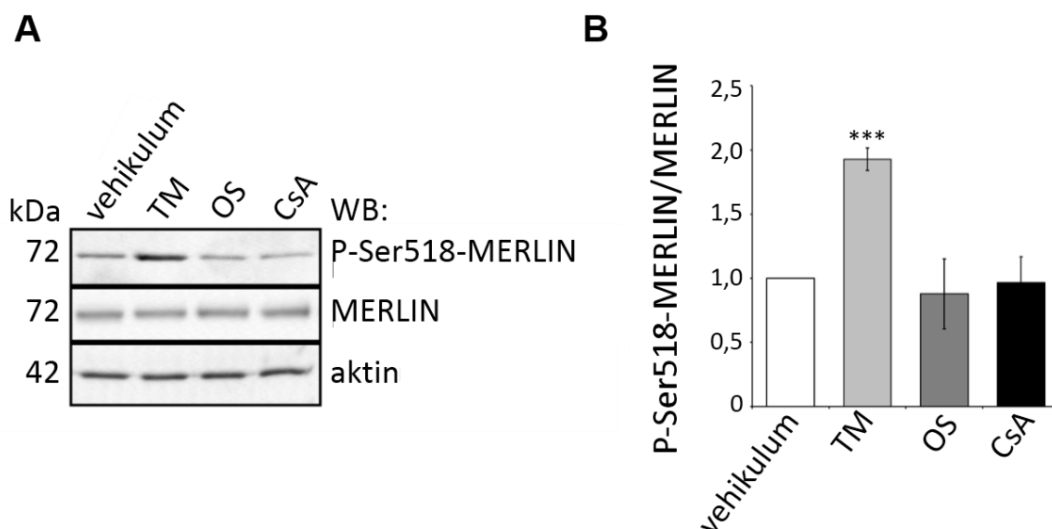
A**B**

7.15. ábra. A TIMAP csendesítés hatásának vizsgálata a merlin és a PP1c kölcsönhatására és a foszfo-Ser518-merlin sejten belüli lokalizációjára. **A:** endotél sejtekben siRNS mediált TIMAP csendesítés, majd specifikus merlin elleni antitesttel immunprecipitációs kísérlet lett végrehajtva. A csendesített és nem-specifikus siRNS-sel kezelt sejtek totál lizátuma és immunprecipitátuma Western blot kísérletben lett vizsgálva specifikus merlin, TIMAP, PP1c és MYPT1 elleni antitestekkel. **B:** BPAE sejtekben siRNS mediált csendesítést követően immunfluoreszcens festés lett végezve specifikus foszfo-Ser518-merlin (zöld) és CD31 (piros) antitestekkel. A sejtmag festése DAPI-val (kék) történt. A másodlagos antitestek nem-specifikus kötődése kontroll kísérletben lett ellenőrizve, melyet a disszertációban nem mutatok be. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja. (Dr. Boratkó Anita eredménye)

7.2.6. A PP1 enzim gátlása növeli a merlin Ser518 oldalláncának foszforilációs szintjét endotél sejtekben

Miután a korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PP1c-TIMAP komplex kötődik a merlin Ser518 oldalláncon foszforilált formájához (7.10. ábra), illetve azt tapasztaltuk, hogy a TIMAP csendesítése hatással van a foszfo-Ser518-merlin membránbeli feldúsulásában (7.15. ábra), bizonyítani akartuk, hogy a holoenzim szerepet játszhat a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában.

Ehhez, BPAE sejteket tautomacetinnel, mint specifikus PP1 enzim gátló szerrel, okadánsavval, mint specifikus PP2A enzim gátló szerrel és ciklosporin A-val, mint specifikus PP2B enzim gátló szerrel kezeltünk 30 percig az *Anyagok és módszerek* fejezet 6. táblázatában leírt koncentrációkban. Ezután a sejteket felkapartuk, majd a kontroll sejtizátumot (vehikulum), illetve a specifikus gátlószerekkel kezelt teljes sejtizátumokat 1xSDS mintapufferben főztük, és Western blotot vizsgáltuk specifikus foszfo-Ser518-merlin, merlin és aktin elleni antitestek felhasználásával (7.16. ábra A).



7.16. ábra. Foszfataz gátló kezelések hatása a merlin Ser518 oldallánc foszforiláltsági szintjére. **A:** endotél sejteket specifikus foszfataz gátló szerekkel kezeltünk. Kísérleteinkhez PP1 gátló tautomacetint (TM), PP2A gátló okadánsavat (OS) és PP2B gátló ciklosporin A-t használtunk. A sejtizátumokat Western blot kísérletben vizsgáltuk specifikus foszfo-Ser518-merlin, merlin és aktin elleni antitestekkel. **B:** a sávok denzitometriás kiértékelését követően az eredményeket ábrázoltuk. A szignifikanciát csillaggal jelöltük: ***: $p < 0,001$. Az ábra három független kísérlet reprezentatív eredményét mutatja.

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 (**7.16. ábra B**).

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.

8. 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 (Zhang és mtsai., 2013), 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 (Cao és mtsai., 2002; Kim és mtsai., 2005; Adyesev és mtsai., 2006; Csontos és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011; Shopik és mtsai., 2013, Boratkó és mtsai., 2013; Boratkó és mtsai., 2016; Boratkó és Csontos, 2017).

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 (Mateyak és Kinzy, 2010). A nukleáris exportban betöltött szerepét a VHL és a PABP1 fehérjék kapcsán detektálták (Khacho és mtsai., 2008b). A fehérjének ez a sejtleletani funkciója különösképp érdekesnek bizonyult számunkra, mivel a TIMAP fehérjét endotél sejtekben a plazmamembrán mellett a sejtmagban, és a mag körüli régióban is detektáltuk (Csontos és mtsai., 2008), 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 (Khacho és mtsai., 2008a; Khacho és mtsai., 2008b). 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

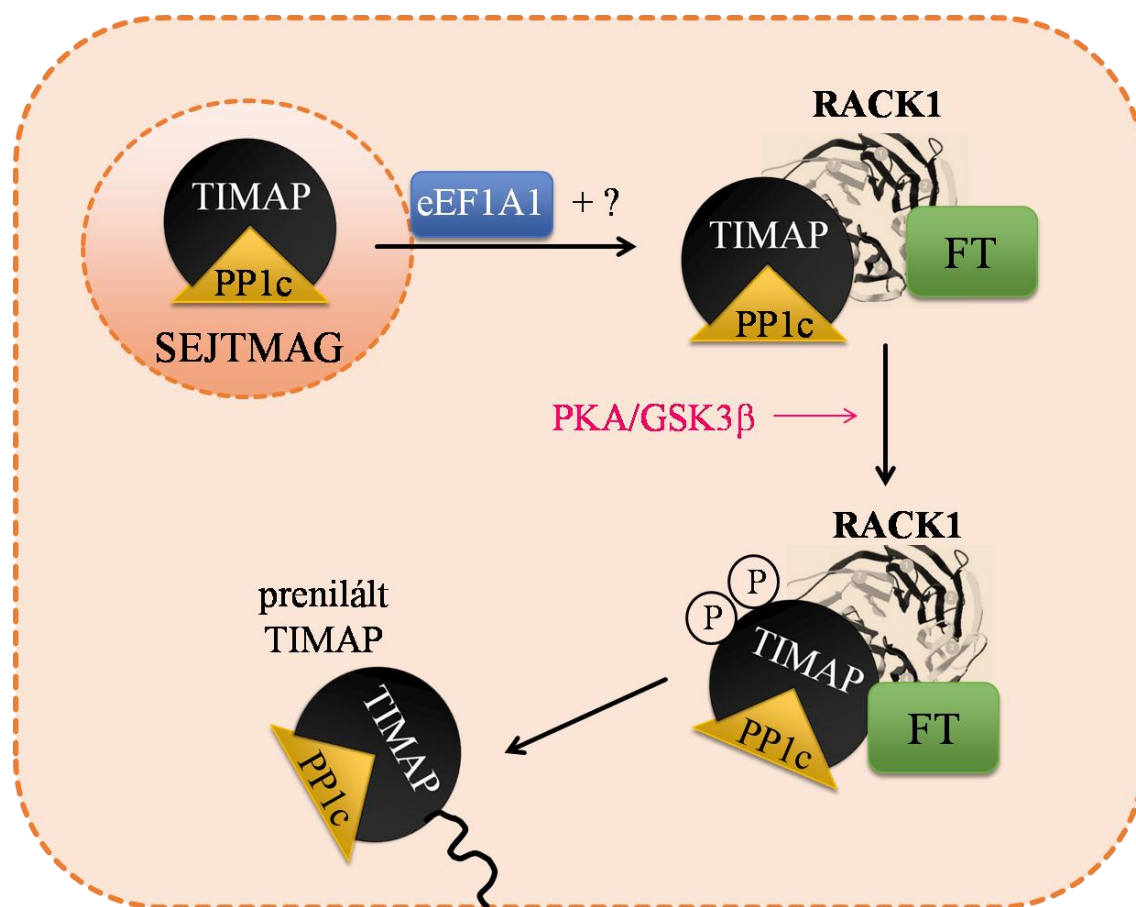
konzervált aminosavat tartalmaz (félkövérrel vannak jelölve a szekvenciában). Az eEF1A1 által mediált nukleáris exportban esszenciális szereppel bíró TD-NEM motívumot leíró munkacsoport eredményei alapján az eEF1A1 és a kölcsönható partnerei közötti kölcsönhatásban a második konzervált aminosavnak (G) kitüntetett szerepe van. Bemutatták, hogy a glicin alaninra történő változtatása drámaian lecsökkentette az eEF1A1 és a VHL, valamint PABP1 fehérjék kölcsönhatását (Khacho és mtsai., 2008a; Khacho és mtsai., 2008b). 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 fehérjecsaldba sorolják (Cao és mtsai., 2002; Csontos és mtsai., 2007). A fehérjecsaldra jellemző ankirin ismétlődések lehetővé teszik, hogy a családba sorolt fehérjék kölcsönhatásba lépjenek különböző fehérjékkel (Sedgwick és Smerdon 1999; Ito et al., 2004). 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 fehérjecsald 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**DHGVRVDVKDW**₂₆₀, vastag: TD-NEM konzervált aminosav, aláhúzott: a

MYPT fehérjecsaldában 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 (8.1. ábra).



8.1. ábra. A TIMAP fehérje sejtmagi exportját, az azt követő poszttranszlációs módosulásait, illetve sejten belüli lokalizációját összefoglaló ábra. A TIMAP az endotél sejtekben a sejtmagjából a citoplazmába transzlokálódik eddig ismeretlen módon, melyben az eEF1A1 fehérje szereppel bírhat. A sejtek citoplazmájában a RACK1 fehérje kötődési felszint biztosít a TIMAP-nak és a farnezil transferáz (FT) enzimnek. A TIMAP PKA és GSK3 β általi foszforilációját követő konformáció változását követően a FT enzim prenilálja a TIMAP-ot, melyet a fehérje plazmamembránba történő transzlokációja követ.

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 nem mutattam be a disszertációban.)

Az eEF1A1 mellett az ERM és az ECE-1 fehérjéket is munkacsoportunk azonosította korábban, mint a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátjait (Csontos és mtsai., 2008; Cszikora és mtsai., 2011; Boratkó és mtsai., 2016). A PP1c-TIMAP elengedhetetlen a sejtek endotelin-1 termelésének szabályozásában azáltal, hogy befolyásolja a PKC által foszforilált ECE-1 defoszforilációját (Boratkó és mtsai., 2016). Az ERM fehérjék defoszforilációján keresztül pedig a komplex szabályozni képes az EC barrier funkciót. Az ERM-eket a Band 4.1 fehérjecsaldába sorolják a merlinnel együtt. A két fehérje között nagyfokú szekvencia homológia figyelhető meg, mely elsősorban a FERM domén első 300 aminosavát érinti (Bretscher és mtsai., 2002; Sun és mtsai., 2002). 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 tumorszuppresszorként funkcionál, és részt vesz a sejtproliferáció szabályozásában. A fehérjének 10 izoformája ismert, de a leginkább az 1-es és a 2-es izoforma kutatott és jellemzett (Morrow és Shevde, 2012). 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 (Sherman és mtsai., 1997; Gonzalez-Agosti és mtsai., 1999).

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 (Boratkó és Csontos, 2017). 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 (Li és mtsai., 2015). Egy másik publikáció arról számol be, hogy a merlin tubulinhoz való kötődése a FERM doménon, illetve a C-terminális doménon keresztül jön létre Schwann sejtekben (Muranen és mtsai., 2007). 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 (Muranen és mtsai., 2007; Li és mtsai., 2015).

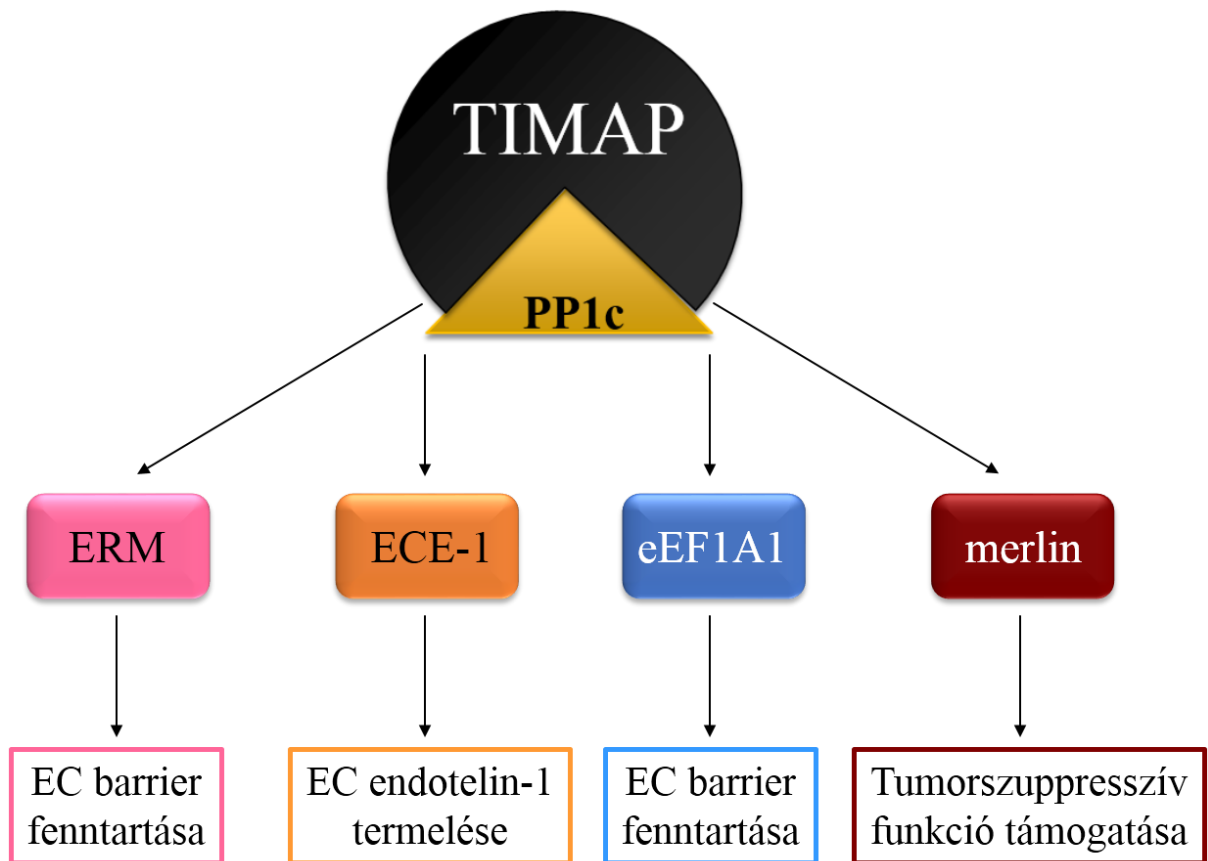
Jól ismert tény, hogy a merlin Ser518 oldalláncon történő foszforilációja hatással van a fehérje biológiai aktivitására, intra-, és intermolekuláris kölcsönhatásaira, továbbá sejten belüli lokalizációjára (Cooper és Giancotti, 2014). A foszforilálatlan merlin tumorszuppresszor funkciót lát el a sejtekben, míg a Ser518 oldalláncon foszforilált forma a tumorszuppresszor funkció szempontjából inaktív (Okada és Giancotti, 2007; Fehon és mtsai., 2010; Bretscher és mtsai., 2012). 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 sejt típusokban 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 (Fukata és mtsai., 2006), ugyanakkor endotél sejtekben ezt a funkciót a TIMAP látja el (Csontos és mtsai., 2008). 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 (Jin és mtsai., 2006). Annak igazolására, hogy endotél sejtekben valóban a TIMAP szerepel, mint a PP1c regulátor alegysége, munkacsoportunk elvégezte a TIMAP csendesítését. A sejt lízátumok 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 PP1 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 enzimen kívül más foszfatáz szereppel bírhat-e a foszfo-Ser518-merlin defoszforilációjában. A merlin Ser518 oldalláncon történő defoszforilációjáról kevés adat áll rendelkezésünkre (Jin és mtsai., 2006), endotél sejtekben pedig ezidáig egyáltalán nem vizsgálták a jelenséget. BPAE sejteket különböző foszfatáz gátlókkal kezeltünk. A tautomocetin egy természetes eredetű toxin, mely koncentrációfüggő módon szelektív gátlószere a PP1 enzimnek. A tautomocetin mellett az okadánsavról közismert, hogy megfelelő koncentrációban alkalmazva specifikus PP2A, míg a ciklosporin A-ról, hogy specifikus PP2B gátló toxin (Sheppeck és mtsai., 1997). A foszfatázgátlók kezelését követően Western blot analízist végeztünk, és azt tapasztaltuk, hogy a specifikus PP1 gátlószer tautomocetin 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 (Stamenkovic és Yu, 2010) –, hogy a merlin defoszforilált formában gátolja az endotél sejtek proliferációját, míg a Ser518 oldalláncon foszforilált formája ezzel ellentétes hatással bír. (Ezt az eredményt nem mutattam be a disszertációban.)

Az értekezésben ismertetett két új PP1c-TIMAP szubsztráttal újabb fehérjék nevét írhatjuk fel a komplex szubsztrátjait összegyűjtő listára (**8.2. ábra**). Ezeknek a fehérjéknek, és a holoenzimmel való kölcsönhatásuknak a megismerésével egyre több ismeretet nyerhetünk az endotél sejtekről, melyek optimális működése elengedhetetlen szerveink megfelelő működésében.



8.2. ábra. A PP1c-TIMAP komplex valószínűsített szubsztrátjai. Színes téglalapban a szubsztrát neve látható, míg a színes keretben a kölcsönhatás funkciójának leírása olvasható.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az endotél sejtek barrier funkciója fontos szerepet tölt be a szervek megfelelő működésében, melyben központi szerepet játszik az endotél sejtek citoszkeletonjának és az ehhez kapcsolódó fehérjéknek a foszforiláltsági szintje. A TIMAP (TGF β -gátolt membrán asszociált fehérje) a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységének (PP1c) regulátor alegységként azonosított fehérje, melynek expressziós szintje endotél sejtekben nagyon magas más sejtípusokhoz 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 tumorszuppresszor 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 tumorszuppresszor 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 tautomocetin 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.

10. SUMMARY

TIMAP (TGF β -inhibited membrane associated protein) is a highly abundant in endothelial cells (EC). It is a member of the MYPT (myosin phosphatase target subunit) protein family, and a regulatory subunit of PP1c.

In this study, we identified eEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 A 1) as a new interacting partner of TIMAP. Besides its canonical role in translation, eEF1A1 may participate in the nuclear export of proteins with TD-NEM (transcription-dependent nuclear export motif), a newly recognized nuclear export signal (DxGxxDxxL) which is crucial in binding to eEF1A1 and in the nuclear export. TIMAP localizes in the nucleus and at the plasma membrane in EC. Since TIMAP contains a region (DHGVRVDV) highly homologous to the TD-NEM motif, we hypothesized that eEF1A1 may be involved in the nuclear export of TIMAP. We found that this TD-NEM-like motif of TIMAP has a critical role in its specific binding to eEF1A1. However, according to our results eEF1A1 is not or not exclusively responsible for the nuclear export of TIMAP. Merlin (moesin-ezrin-radixin like protein), the product of neurofibromatosis type 2 gene, was primarily recognized as a tumor suppressor, but it also functions as a membrane-cytoskeletal linker and regulator of multiple signaling pathways. The activity and localization of merlin is regulated phosphorylation of the Ser518 side chain. Merlin localizes in the nucleus when the Ser518 side chain is not phosphorylated, while the phosphorylated form is present in the cytoplasm and the plasma membrane. We showed that EC express both merlin 1 and 2 isoforms. Furthermore, we identified a protein-protein interaction between PP1c-TIMAP and identified the N-terminal part of TIMAP and FERM domain of merlin as critical regions of the interaction. In addition, we detected that TIMAP is able to bind phospho-Ser518-merlin. In EC co-immunoprecipitation of merlin with PP1c-TIMAP was also shown, but there was no detectable interaction between merlin and PP1c in TIMAP depleted cells. In addition MYPT1 is expressed in EC, but no interaction was detected with merlin regardless the presence or absence of TIMAP. Results of immunofluorescent staining of TIMAP depleted and non-siRNA treated EC suggest that the complex regulates dephosphorylation of phospho-Ser518-merlin. To test whether PP1c is alone responsible for dephosphorylation of merlin, EC lysates were treated with specific phosphatase inhibitors. In the presence of tautomycin, a potent PP1 inhibitor, the phosphorylation level of merlin was elevated implying that a type-1 phosphatase dephosphorylates phospho-Ser518-merlin.

In summary, this work focused on two newly identified interacting partner of TIMAP in EC, which provide important informations about the role of TIMAP protein in EC.

11. TÁRGYSZAVAK

endotél sejtek

reverzibilis fehérje foszforiláció

protein foszfatáz 1

TIMAP

eEF1A1

merlin

foszfo-Ser518-merlin

pull down

immunprecipitáció

12. KEYWORDS

endothelial cells

reversible protein phosphorylation

protein phosphatase 1

TIMAP

eEF1A1

merlin

phospho-Ser518-merlin

pull down

immunoprecipitation

13. IRODALOMJEGYZÉK

13.1. A PhD értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

Adyshev, D.M., I.A. Kolosova, and A.D. Verin, *Potential protein partners for the human TIMAP revealed by bacterial two-hybrid screening*. Mol Biol Rep, 2006. 33(2): p. 83-9.

Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. 100(2): p. 158-73.

Alessi, D., et al., *The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1*. Eur J Biochem, 1992. 210(3): p. 1023-35.

Andersen, G.R. and J. Nyborg, *Structural studies of eukaryotic elongation factors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2001. 66: p. 425-37.

Andersen, G.R., et al., *Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1B α complex*. Nat Struct Biol, 2001. 8(6): p. 531-4.

Andersen, G.R., et al., *Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A:eEF1B α* . Mol Cell, 2000. 6(5): p. 1261-6.

Antonetti, D.A., et al., *Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors*. J Biol Chem, 1999. 274(33): p. 23463-7.

Aramburu, J., A. Rao, and C.B. Klee, *Calcineurin: from structure to function*. Curr Top Cell Regul, 2000. 36: p. 237-95.

Arimura, T., et al., *Identification, characterization, and functional analysis of heart-specific myosin light chain phosphatase small subunit*. J Biol Chem, 2001. 276(9): p. 6073-82.

Attwood, P.V., et al., *Focus on phosphohistidine*. Amino Acids, 2007. 32(1): p. 145-56.

- Barford, D., A.K. Das, and M.P. Egloff, *The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. 27: p. 133-64.
- Barford, D., *Protein phosphatases*. Curr Opin Struct Biol, 1995. 5(6): p. 728-34.
- Bianchi, A.B., et al., *Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types*. Nat Genet, 1994. 6(2): p. 185-92.
- Biswas, P., et al., *PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation*. Am J Pathol, 2006. 169(1): p. 314-24.
- Bogatcheva, N.V., et al., *Caldesmon is a cytoskeletal target for PKC in endothelium*. J Cell Biochem, 2006. 99(6): p.1593-605
- Bogatcheva, N.V. and A.D. Verin, *The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function*. Microvasc Res, 2008. 76(3): p. 202-7.
- Bohnsack, M.T., et al., *Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm*. EMBO J, 2002. 21(22): p. 6205-15.
- Boratkó, A., P. Gergely, and C. Csontos, *RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners*. Cell Commun Signal, 2013. 11(1): p. 2.
- Boratkó, A., et al., *TIMAP-protein phosphatase 1-complex controls endothelin-1 production via ECE-1 dephosphorylation*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. 73: p. 11-8.
- Boratkó, A., és Csontos C., *PKC mediated phosphorylation of TIMAP regulates PP1c activity and endothelial barrier function*. Biochim Biophys Acta., 2017. 1864(2): p. 431-439.
- Bott, M., et al., *The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma*. Nat Genet, 2011. 43(7): p. 668-72.
- Boudrez, A., et al., *Identification of MYPT1 and NIPPI as subunits of protein phosphatase 1 in rat liver cytosol*. FEBS Lett, 1999. 455(1-2): p. 175-8.

- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(8): p. 586-99.
- Calado, A., et al., *Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA*. EMBO J, 2002. 21(22): p. 6216-24.
- Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. 25(9): p. 1327-33.
- Cao, W., et al., *TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 283(1): p. C327-37.
- Ceulemans, H., W. Stalmans, and M. Bollen, *Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution*. Bioessays, 2002. 24(4): p. 371-81.
- Cheng, J.Q., et al., *Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation*. Genes Chromosomes Cancer, 1999. 24(3): p. 238-42.
- Chuang, S.M., et al., *Proteasome-mediated degradation of cotranslationally damaged proteins involves translation elongation factor 1A*. Mol Cell Biol, 2005. 25(1): p. 403-13.
- Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. 58: p. 453-508.
- Cohen, P.T., *Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life*. Trends Biochem Sci, 1997. 22(7): p. 245-51.
- Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 2): p. 241-56.
- Cohen, P.T., *Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene*. FEBS Lett, 1988. 232(1): p. 17-23.
- Cooper, J. and F.G. Giancotti, *Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function*. FEBS Lett, 2014. 588(16): p. 2743-52.

- Csortos, C., et al., *TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(3): p. L440-50.
- Csortos, C., I. Kolosova, and A.D. Verin, *Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293(4): p. L843-54.
- Czikora, I., et al., *Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1*. Biochimie, 2011. 93(7): p. 1139-45.
- Dagliesh, G.L., et al., *Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes*. Nature, 2010. 463(7279): p. 360-3.
- Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. 351(Pt 1): p. 95-105.
- Davis, W.G., et al., *Interaction between the cellular protein eEF1A and the 3'-terminal stem-loop of West Nile virus genomic RNA facilitates viral minus-strand RNA synthesis*. J Virol, 2007. 81(18): p. 10172-87.
- Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: Happy together*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004. 5(4): p. 261-270.
- Denu, J.M. and J.E. Dixon, *Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation*. Curr Opin Chem Biol, 1998. 2(5): p. 633-41.
- Depaoli-Roach, A.A., et al., *Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function*. Adv Enzyme Regul, 1994. 34: p. 199-224.
- Dreher, T.W., *Functions of the 3'-Untranslated Regions of Positive Strand Rna Viral Genomes*. Annu Rev Phytopathol, 1999. 37: p. 151-174.
- Dudek, S.M. and J.G. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. J Appl Physiol (1985), 2001. 91(4): p. 1487-500.

- Egloff, M.P., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate*. J Mol Biol, 1995. 254(5): p. 942-59.
- Egloff, M.P., et al., *Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1*. EMBO J, 1997. 16(8): p. 1876-87.
- Ehringer, W.D., et al., *Quantitative image analysis of F-actin in endothelial cells*. Microcirculation, 1999. 6(4): p. 291-303.
- Eichhorn, P.J., M.P. Creighton, and R. Bernards, *Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1795(1): p. 1-15.
- Ermert, L., et al., *Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs*. Am J Physiol, 1995. 268(5 Pt 1): p. L753-61.
- Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher, *Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. 11(4): p. 276-87.
- Feletou, M., in *The Endothelium: Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. 2011: San Rafael (CA).
- Ferrero, T., et al., *Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000. 278(6): p. L1107-17.
- Fujioka, M., et al., *A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping*. Genomics, 1998. 49(1): p. 59-68.
- Fukata, Y., et al., *Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase*. J Cell Biol, 1998. 141(2): p. 409-18.
- Garcia, J.G., et al., *Critical involvement of p38 MAP kinase in pertussis toxin-induced cytoskeletal reorganization and lung permeability*. FASEB J, 2002. 16(9): p. 1064-76.

Giepmans, B.N., *Gap junctions and connexin-interacting proteins*. Cardiovasc Res, 2004. 62(2): p. 233-45.

Gladden, A.B., et al., *The NF2 tumor suppressor, Merlin, regulates epidermal development through the establishment of a junctional polarity complex*. Dev Cell, 2010. 19(5): p. 727-39.

Goeckeler, Z.M. and R.B. Wysolmerski, *Myosin phosphatase and cofilin mediate cAMP/cAMP-dependent protein kinase-induced decline in endothelial cell isometric tension and myosin II regulatory light chain phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. 280(38): p. 33083-95.

Golovkina, K., et al., *Evolution and origin of merlin, the product of the Neurofibromatosis type 2 (NF2) tumor-suppressor gene*. BMC Evol Biol, 2005. 5: p. 69.

Gonzalez-Agosti, C., et al., *Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHE-RF*. J Biol Chem, 1999. 274(48): p. 34438-42.

Gonzalez-Agosti, C., et al., *The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles*. Oncogene, 1996. 13(6): p. 1239-47.

Grassie, M.E., et al., *The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta*. Arch Biochem Biophys, 2011. 510(2): p. 147-59.

Gusella, J.F., et al., *Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1423(2): p. M29-36.

Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. 9(8): p. 576-96.

Hartshorne, D.J., M. Ito, and F. Erdodi, *Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation*. J Muscle Res Cell Motil, 1998a. 19(4): p. 325-41.

Hartshorne, D.J., *Myosin phosphatase: subunits and interactions*. Acta Physiol Scand, 1998b. 164(4): p. 483-93.

Hoffman, G.S., *Determinants of vessel targeting in vasculitis*. Clin Dev Immunol, 2004. 11(3-4): p. 275-9.

Huber, A.H. and W.I. Weis, *The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin*. Cell, 2001. 105(3): p. 391-402.

Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. 80(2): p. 225-36.

Ito, M., et al., *Myosin phosphatase: structure, regulation and function*. Mol Cell Biochem, 2004. 259(1-2): p. 197-209.

Jackson, M.D. and J.M. Denu, *Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry*. Chem Rev, 2001. 101(8): p. 2313-40.

Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. Biochem J, 2001. 353(Pt 3): p. 417-39.

Jin, H., et al., *Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase*. Nature, 2006. 442(7102): p. 576-9.

Johnson, K.C., et al., *Cellular transformation by a FERM domain mutant of the Nf2 tumor suppressor gene*. Oncogene, 2002. 21(39): p. 5990-7.

Kása, A., C. Csontos, and A.D. Verin, *Cytoskeletal mechanisms regulating vascular endothelial barrier function in response to acute lung injury*. Tissue Barriers, 2015. 3(1-2): p. e974448.

Kása, A., et al., *Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells*. Microvasc Res, 2013. 89: p. 86-94.

Khacho, M., et al., *Cancer-causing mutations in a novel transcription-dependent nuclear export motif of VHL abrogate oxygen-dependent degradation of hypoxia-inducible factor*. Mol Cell Biol, 2008a. 28(1): p. 302-14.

Khacho, M., et al., *eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery*. Mol Biol Cell, 2008b. 19(12): p. 5296-308.

Kim, K., et al., *The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 338(3): p. 1327-34.

Kiss, E., et al., *Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton*. Biochem J, 2002. 365(Pt1): p. 79-87.

Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang, *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. J Biol Chem, 1998. 273(22): p. 13367-70.

Klee, C.B., T.H. Crouch, and M.H. Krinks, *Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(12): p. 6270-3.

Kolozsvári, B., et al., *Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase*. Cardiovasc Res, 2012. 96(3): p. 494-503.

LaJeunesse, D.R., B.M. McCartney, and R.G. Fehon, *Structural analysis of Drosophila merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization*. J Cell Biol, 1998. 141(7): p. 1589-99.

Lallemand, D., et al., *NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions*. Genes Dev, 2003. 17(9): p. 1090-100.

Lau, Y.K., et al., *Merlin is a potent inhibitor of glioma growth*. Cancer Res, 2008. 68(14): p. 5733-42.

Li, W., et al., *Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4(DCAF1) in the nucleus*. Cell, 2010. 140(4): p. 477-90.

Li, Y., et al., *Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway*. Cell Res, 2015. 25(7): p. 801-17.

- Li, Z., et al., *Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor*. *Virology*, 2009. 385(1): p. 245-60.
- Lontay, B., et al., *Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells*. *J Comp Neurol*, 2004. 478(1): p. 72-87.
- Lund, A., et al., *Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3*. *Genomics*, 1996. 36(2): p. 359-61.
- MacDonald, J.A., et al., *Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosine phosphatase, by MYPT-associated kinase*. *FEBS Lett*, 2001. 493(2-3): p. 91-4
- Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1912-34.
- Mateyak, M.K. and T.G. Kinzy, *eEF1A: thinking outside the ribosome*. *J Biol Chem*, 2010. 285(28): p. 21209-13.
- McCartney, B.M. and R.G. Fehon, *Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the Drosophila homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin*. *J Cell Biol*, 1996. 133(4): p. 843-52.
- McClatchey, A.I. and R.G. Fehon, *Merlin and the ERM proteins--regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex*. *Trends Cell Biol*, 2009. 19(5): p. 198-206.
- McClatchey, A.I., *Neurofibromatosis*. *Annu Rev Pathol*, 2007. 2: p. 191-216.
- Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. *Physiol Rev*, 2006. 86(1): p. 279-367.
- Mingot, J.M., et al., *eEF1A mediates the nuclear export of SNAG-containing proteins via the Exportin5-aminoacyl-tRNA complex*. *Cell Rep*, 2013. 5(3): p. 727-37.

- Morrison, H., et al., *The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44*. Genes Dev, 2001. 15(8): p. 968-80.
- Morrow, K.A. and L.A. Shevde, *Merlin: the wizard requires protein stability to function as a tumor suppressor*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1826(2): p. 400-6.
- Muranen, T., et al., *The tumor suppressor merlin interacts with microtubules and modulates Schwann cell microtubule cytoskeleton*. Hum Mol Genet, 2007. 16(14): p. 1742-51.
- Murányi, A., et al., *Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunits in by integrin-linked kinase*. Biochem J, 2002. 366(Pt 1): p. 211-6.
- Murthy, A., et al., *NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins*. J Biol Chem, 1998. 273(3): p. 1273-6.
- Negrutskii, B., D. Vlasenko, and A. El'skaya, *From global phosphoproteomics to individual proteins: the case of translation elongation factor eEF1A*. Expert Rev Proteomics, 2012. 9(1): p. 71-83.
- Negrutskii, B.S. and A.V. El'skaya, *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. 60: p. 47-78.
- Okada, T., L. You, and F.G. Giancotti, *Shedding light on Merlin's wizardry*. Trends Cell Biol, 2007. 17(5): p. 222-9.
- Okada, T., M. Lopez-Lago, and F.G. Giancotti, *Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane*. J Cell Biol, 2005. 171(2): p. 361-71.
- Okubo, S., et al., *A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 200(1): p. 429-34.

Panasyuk, G., et al., *A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(1): p. 63-71.

Park, D.W., et al., *Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins*. BMB Rep, 2011. 44(4): p. 279-84.

Pecina-Slaus, N., *Merlin, the NF2 gene product*. Pathol Oncol Res, 2013. 19(3): p. 365-73.

Pellegrino, R., et al., *EEF1A2 inactivates p53 by way of PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4 in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2014. 59(5): p. 1886-99.

Pittman, Y.R., et al., *Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B α* . J Biol Chem, 2009. 284(7): p. 4739-47.

Poirier, C., et al., *TIMAP protects endothelial barrier from LPS-induced vascular leakage and is down-regulated by LPS*. Respir Physiol Neurobiol, 2011. 179(2-3): p. 334-7.

Rouleau, G.A., et al., *Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2*. Nature, 1993. 363(6429): p. 515-21.

Roura, S., et al., *Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1999. 274(51): p. 36734-40.

Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: form and function*. Physiol Rev, 2000. 80(4): p. 1483-521.

Rustgi, A.K., et al., *Neurofibromatosis 2 gene in human colorectal cancer*. Cancer Genet Cytogenet, 1995. 84(1): p. 24-6.

Sainio, M., et al., *Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton*. J Cell Sci, 1997. 110 (Pt 18): p. 2249-60.

- Schaphorst, K.L., et al., *Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. 17(4): p. 443-55.
- Scherer, S.S. and D.H. Gutmann, *Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells*. J Neurosci Res, 1996. 46(5): p. 595-605.
- Schulz, I., et al., *A non-canonical function of eukaryotic elongation factor 1A1: regulation of interleukin-6 expression*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1843(5): p. 965-75.
- Scoles, D.R., et al., *Schwannomin inhibits tumorigenesis through direct interaction with the eukaryotic initiation factor subunit c (eIF3c)*. Hum Mol Genet, 2006. 15(7): p. 1059-70.
- Sedgwick, S.G. and S.J. Smerdon, *The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework*. Trends Biochem Sci, 1999. 24(8): p. 311-6.
- Shaw, R.J., A.I. McClatchey, and T. Jacks, *Localization and functional domains of the neurofibromatosis type II tumor suppressor, merlin*. Cell Growth Differ, 1998. 9(4): p. 287-96.
- Shepeck, J.E., et al., *Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins*. Bioorg Med Chem, 1997. 5(9): p. 1739-50.
- Sherman, L., et al., *Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product*. Oncogene, 1997. 15(20): p. 2505-9.
- Shi, Y., *Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure*. Cell, 2009. 139(3): p. 468-84.
- Shichi, D., et al., *Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1*. J Biol Chem, 2010. 285(44): p. 33680-90.
- Shiina, N., et al., *Microtubule severing by elongation factor 1 alpha*. Science, 1994. 266(5183): p. 282-5.

- Shimizu, T., et al., *Structural basis for neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain*. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10332-6.
- Shopik, M.J., et al., *Multi-directional function of the protein phosphatase 1 regulatory subunit TIMAP*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 435(4): p. 567-73.
- Soares, D.C. and C.M. Abbott, *Highly homologous eEF1A1 and eEF1A2 exhibit differential post-translational modification with significant enrichment around localised sites of sequence variation*. Biol Direct, 2013. 8: p. 29.
- Stamenkovic, I. and Q. Yu, *Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival*. Curr Protein Pept Sci, 2010. 11(6): p. 471-84.
- Stamenkovic. I., and Yu, Q., *Merlin, a "magic" linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival*. Curr Protein Pept Sci, 2010. 11(6): p. 471-84.
- Sun, C.X., V.A. Robb, and D.H. Gutmann, *Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 21): p. 3991-4000.
- Takizawa, N., et al., *Dephosphorylation of the two regulatory components of myosine phosphatase, MBS and CPI-17*. FEBS Lett, 2002. 515(1-3): p. 127-32.
- Tar, K., et al., *Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure*. J Cell Biochem, 2006. 98(4): p. 931-53.
- Trofatter, J.A., et al., *A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor*. Cell, 1993. 75(4): p. 826.
- Tuma, P. and A.L. Hubbard, *Transcytosis: crossing cellular barriers*. Physiol Rev, 2003. 83(3): p. 871-932.
- Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. 291(5507): p. 1304-51.

Wong, E.Y., et al., *Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells*. *Biochem J*, 2000. 346 Pt 1: p. 209-16.

Wu, Y., et al., *Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants*. *J Muscle Res Cell Motil*, 2005. 26(2-3): p. 123-34.

Yi, C., et al., *A tight junction-associated Merlin-angiomin complex mediates Merlin's regulation of mitogenic signaling and tumor suppressive functions*. *Cancer Cell*, 2011. 19(4): p. 527-40.

Zhang, M., et al., *Viewing serine/threonine protein phosphatase through the eyes of drug designers*. *FEBS J.*, 2013. 280(19): p. 4739-60

Zoch, A., et al., *Merlin Isoforms 1 and 2 Both Act as Tumour Suppressors and Are Required for Optimal Sperm Maturation*. *PLoS One*, 2015. 10(8): p. e0129151.

Zolnierowicz, S., *Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways*. *Biochem Pharmacol*, 2000. 60(8): p. 1225-35.

13.2. A PhD értekezés alapját képező saját közlemények jegyzéke



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

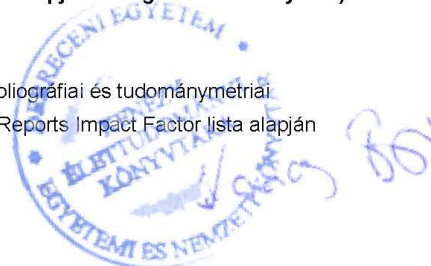
1. Boratkó, A.*, **Péter, M.***, Csontos, C.: Regulation of merlin by protein phosphatase 1-TIMAP and EBP50 in endothelial cells.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 82, 10-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.11.010>
**Anita Boratkó and Margit Péter contributed equally to this work.*
IF: 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

14. KONFERENCIA ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

14.1. 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.

Péter Margit: Protein-protein interactions in endothelial cells

Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine

Debrecen, 2014. szeptember 4.

Péter Margit, 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.

14.2. Konferencia poszterek

Anita Boratkó, **Margit Péter**, Csilla Csontos: Interaction of TIMAP-PP1c complex with merlin

Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society

Szeged, 2016. augusztus 28-31.

Péter Margit*, Boratkó Anita*, Csontos Csilla: A TIMAP-PP1c komplex szerepének vizsgálata a merlin^{Ser518} szabályozásában. *megosztott első szerzők

46. Membrán-Traszport Konferencia

Sümege, 2016. május 17-20.

15. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Bár Weöres Sándor szerint „*A teljes tudás: adat-nélküli*”¹, mégis ehhez a munkához sok-sok adatra volt szükség, melyben sok-sok ember nagy segítségemre volt. Ezért az alábbi sorokban szeretném megköszönni mindazoknak, akik PhD tanulmányaim alatt bármilyen formában támogattak:

Először is hálásan köszönöm témavezetőmnek **Dr. Csontos Csillának** a munkámhoz nyújtott segítségét, támogatását, illetve nélkülözhetetlen hozzájárulását a disszertáció jelen formájához.

Köszönöm **Dr. Boratkó Anitának**, aki nem csak elméleti, de számos gyakorlati tanáccsal is hozzájárult a kísérletek sikeres kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Virág Lászlónak**, az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának, hogy munkámat lehetővé tette az intézetben.

Szeretnék köszönetet mondani **Sugáné Somogyi Ritának** barátságáért, a laboratórium jó hangulatáért és a kísérletes munkában nyújtott segítségéért. Köszönöm munkacsoportunk további asszisztenseinek, **Barta Kittinek** és **Kovács Elődnek** a segítséget. Hálás vagyok a szomszéd laborból **Tankáné Farkas Andreának** a segítségéért, ő a legreménytelenebb puffereket is villámgyorsan „bepéházta”.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a vidám légkört, a – legtöbbször – lelkesítő közös ebédeket és a munkámhoz nyújtott segítségüket. Különösképpen hálás vagyok **Petrényi Katalinnak** és **Sipos Adriennek** barátságukért, és hogy nem csak szakmailag voltak sokszor a segítségemre, de a nehéz időkben bíztattak is.

A konstruktok szekvenálásáért **Dr. Bereczky Zsuzsannának** és **Gindele Rékának** mondok köszönetet. Réka egyben már lassan két évtizede a barátom is, így nem csak sok szép szekvenciát, de sok biztató szót is köszönhetek neki.

Barátaimnak (Szandinak, Blankának és Áginak) köszönöm a támogatást, a biztatást, és hogy mindig mellettem álltak az elmúlt évek során.

Végül, de leginkább szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni a **Családomnak**. Köszönöm **Zsoltinak**, aki nem csak a „science-ben” volt nap, mint nap támaszom, de szeretetével és türelmével támogatott, biztatott munkám során, és számtalanszor meggyőzött arról, hogy „kell ez nekem”. Köszönöm két Öcsém, **Misi** és **Máté**, továbbá **Nagymamám** támogatását és szeretetét. Legmélyebb hálámat **Szüleimnek** szeretném kifejezni feltétlen szeretetükért, támogatásukért, biztatásukért, hogy kicsi korom a tanulás szeretetére neveltek és példát mutattak.

Köszönöm Istennek, a támogatást, a segítséget, és a folytonos újraépülő reményt.

„Egyetlen ismeret van, a többi csak toldás: Alattad a föld, fölötted az ég, benned a létra.”

Weöres Sándor: A teljesség felé

¹ Weöres Sándor: A teljesség felé

16. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különnyomata.