

TDK dolgozat

Foszforiláció hatása a magi transzportra

A leánysejtek öröksége

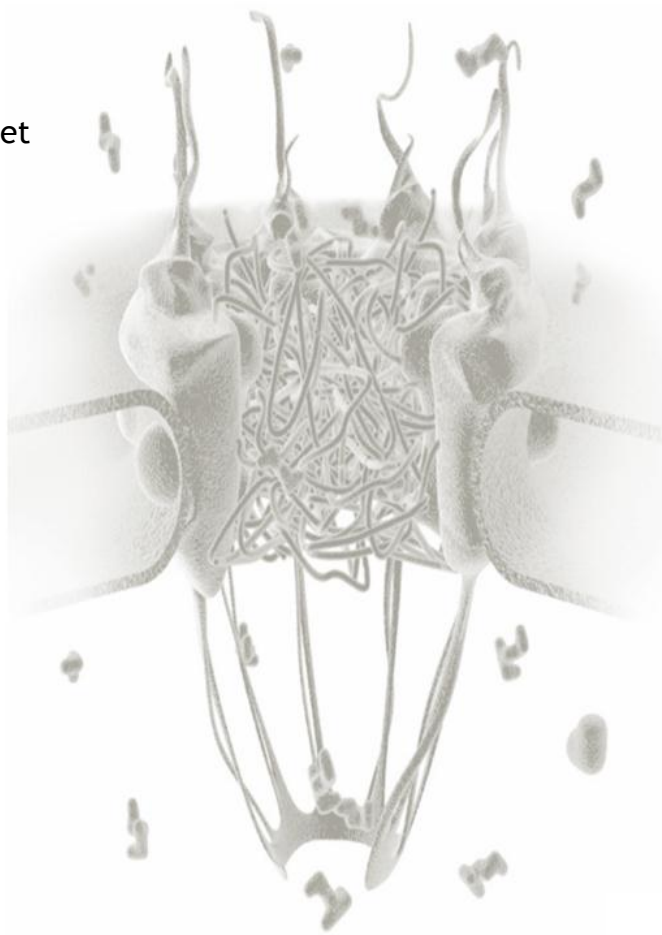
Borsos Máté

Eötvös Lóránd Tudományegyetem,
Biológus BSc, IV. évfolyam

Témavezető:

Róna Gergely

MTA, Enzimológiai intézet



Készült:

a Magyar Tudományos Akadémia
Enzimológiai Intézetében

Budapest, 2011.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás:	2
Bevezető	3
Célkitűzések	6
Anyag és módszer	8
Plazmid konstrukciók létrehozása	8
Sejtkultúrák fenntartása és transzfekciója	9
Immunhiszto- és immuncitokémia	9
A D. virilis dUTPáz „A” és „ABC” valamint egér importin- α Δ IBB expresszió	10
Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával és gélszűrőssel	10
Natív Poliakrilamid Gélelektroforézis	11
ITC (izotermális titrációs mikroklorimetria)	11
Eredmények	12
A szignál közeli foszforiláció hatása az NLS aktivitására	12
NLS finomszabályzás vizsgálata Drosophila dUTPáz modellen	21
Az importin- α dUTPáz komplex biofizikai jellemzése	28
Diskusszió: általános modell felállítása	31
Irodalom	33
Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez	36

Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm csoportvezetőmnek, *Dr. Vértessy Beátának*, hogy lehetőséget biztosított számomra a csoportban való munkára és, hogy hasznos tanácsaival látott el.

Köszönöm *Buday Lászlónak*, az Enzimológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette az intézetben végzett munkámat.

Kiemelt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, *Róna Gergelynek*, aki bevezetett a laboratóriumi munka világába és tanított nagy türelemmel, odafigyeléssel és részletességgel; munkámat lelkesítően felügyelte és segítette.

Köszönettel tartozom *Pálinkás Hajnalkának*, akivel a fehérjetisztítást és a komplexek biofizikai vizsgálatát együtt végeztem.

Köszönöm *Horváth Andrásnak* és *Zagyva Imrének*, a *Drosophila* szövetek boncolását.

Továbbá szeretném megköszönni a *teljes kutatócsoportnak* a kellemes légkört és támogatásukat.

Bevezető

Az eukarióták kompartmentalizációja szükségessé tette a sejtorganellek közötti transzportáló rendszerek létrejöttét. A nagyobb méretű makromolekulák esetében az organellek közötti anyagvándorlás aktív transzport folyamatok révén valósul meg [1]. Ezzel az eukarióták egy térben és időben hatékonyan szabályozható rendszerhez jutottak, ami elősegíti az elkülönített DNS állományt körülvevő tér anyagi összetételének pontos és dinamikus beállítását.

A 40 kDa méret feletti fehérjék aktív transzportja a magmembrán erre specializált egységein, a nukleáris pórus komplexeken (NPC) keresztül valósul meg [2]. Az átjutást általában az importálódó (cargo) fehérjéken lévő nukleáris lokalizációs szignál (NLS) biztosítja [3, 4]. Ezt az NLS-t ismerik fel és kötik meg a karioferin fehérje család (nukleáris transzport receptorok) tagjai, például az importin- α adaptor fehérje [5, 6]. Az NLS aminosav szekvencia tartalmaz egy bázikus, lizinben/argininben gazdag 2-6 tagú klasztert, amelyet sok esetben egy flexibilitást biztosító prolin előz meg [7]. Általánosan az egy pozitív klasztert tartalmazó szignálok (monopartit NLS) az elterjedtek, de megkülönböztetnek két ilyen szakaszt tartalmazóakat is (bipartit NLS) [1, 3]. Ez utóbbi esetben egy 10-15 aminosav hosszú összekötő régió választja el a két bázikus blokkot (az egyik általában 2, a másik 2-6 tagú) [8, 9]. Mutációs analízis és szerkezet vizsgálatok révén állapították meg a monopartit NLS közelítő konszenzus szekvenciát: K(K/R)X(K/R) [6, 10]. Az általánosan elterjedt jelölés az NLS-ek egyes aminosavaira az importin- α kötőárába való illeszkedésük alapján történik. Az importin- α felületén különböző, egy-három aminosav oldalláncból álló kötőzsebeket definiáltak, amelyek egy-egy meghatározott NLS oldallánccal létesítenek kapcsolatot. A monopartit NLS-eket azok N-terminális konzervált lizinjétől (K), P2-es jelöléssel indítva számozzuk [11]. Ez a P2 pozíció szigorúan lizinre korlátozott, mutációja többnyire teljes mértékben elrontja a magi lokalizációt. A konszenzus szekvencián látható, hogy a P3 és P5 hely jóval toleránsabb a P2-nél, itt mind lizin és arginin (R) is megjelenhet. Ezen egyes pozíciók önálló kötési energiája csak $2/3$ -a a P2 pozícióban található lizin kötési energiájának. A P4 pozíció még ezeknél is jóval engedékenyebb, a P2-höz hasonlítva csak $1/4$ részben járul hozzá a kötődéshez [12]. A konszenzus szekvencián itt nem jelölt P1 pozícióban gyakran helyezkedik el a már említett szekunder szerkezettörő prolin [7]. Tipikus monopartit NLS szekvencia az SV40 vírus T-antigén szignálja (126 PKKKRKV 132) [13].

Az importin- α egy erősen konzervált makromolekula, aminek az C-terminális régiójában egy tíz darab Armadillo motívumból álló NLS kötő domén helyezkedik el; az N-terminális régiójában pedig egy importin- β kötő domén (IBB) található [14]. Az NLS-en keresztül összekapcsolódott importin- α /cargo fehérje komplexet az importin- β segíti át a magpórusokon. Ez úgy valósul meg, hogy az importin- β az adaptor funkciót betöltő importin- α fehérjét annak IBB doménjén keresztül magához köti, így gyakorlatilag egy három komponensből álló komplex (cargo/importin- α /importin- β) lép be a sejtmagba [15, 16]. Érdekes, hogy ez az IBB domén hordoz egy bázikus KRR szekvencia motívumot is, ami egy gyenge NLS-t utánoz. A cargo fehérjék NLS szignáljai ezzel az autoinhibíciós doménnel versengenek a kötőhelyért [17]; a cargo csak akkor fog az importin- α -ból és β -ból álló komplexhez kötődve a magba jutni, ha a cargo NLS-ének kötése energetikailag kedvezőbb, mint az IBB doméné [18].

Az irodalomból ismert, hogy az NLS által közvetített magi transzportra hatással lehetnek a szignál melletti poszt-transzlációs módosítások. Számos fehérje esetében leírták, hogy egy NLS közeli foszforiláció kihat annak sejten belüli elhelyezkedésre [19-21]. Arról azonban, hogy a keletkezett foszfoszerin az NLS-hez képest milyen pozícióból (milyen távolságra az NLS pozitív blokkjától) pontosan hogyan befolyásolhatja a lokalizációt (serkenti, gátolja, esetleg nincs hatással) még nem született egyértelmű konszenzus. A foszforiláció hatása szerteágazó lehet: elősegítheti a magba jutást azzal, hogy az export szignált elfedi [22]; konformáció változást

CDK1 kináz foszforilálja	DUT-N	SPSPKRRARPA-	foszforilációval gátolt magi import
	SV40	SPPKKKRKV--	
	CDC6	SPRKRL----	
	SWI6	SPLKKLKID-	
	SWI5	SPPRKGRPRK	
	CDH1	SPRKPTRKI-	
	MCM3	SPKKRQKV--	
	Acm1	SPSPKRRSQID	
.....			
egyéb kináz foszforilálja	APC	SPPKKKKP---	foszforilációval gátolt magi import
	LMB2	SRGKRRRIE-	
	v-jun	SRKRKLRI--	
	AhR	SRKRRKPVQ-	
	atDjC6	SPKRKS----	
	EBNA-1	SSPSRPRK--	
.....			
CDK1 kináz foszforilálja	p53	SPQPKKKPL-	foszforilációval gátolt magi import
	UBA1	SPLSKKRRVS	
	UNG2	SPSPARKRHAP-	

1. táblázat

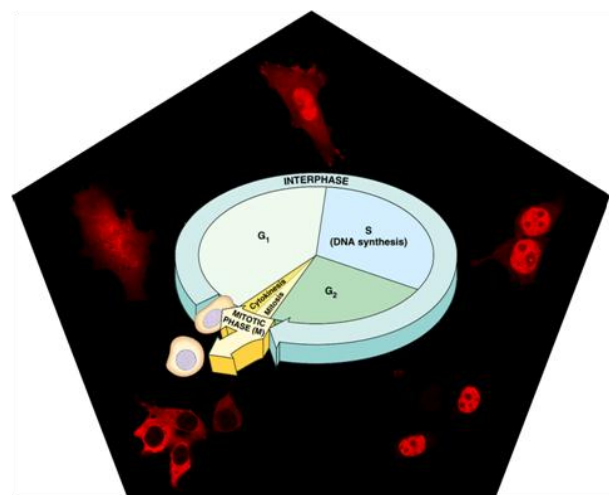
Foszforiláció NLS funkcióra gyakorolt hatása.

Az első két blokk fehérjéről ismert, hogy magi transzportjuk foszforilációval gátolt; kísérletesen az alsó három fehérjét vizsgáltam. Az NLS szekvenciákban **bordó**val a sejten foszforilálódni képes szerin, **kék**kel a bázikus klaszter tagjai, **zöld**del pedig a CDK1 konszenzus foszforilációs szekvenciájában is található prolin van jelölve.

indukálhat, és ezáltal hozzáférhetőbbé teheti az NLS-t az importinok számára; vagy például növelheti az NLS-importin komplex kötéseerősségét [20]. Más esetekben a foszforiláció meggátolja a sejtmagba irányuló transzportot, aminek leggyakoribb oka, hogy az NLS-ük közelében foszforilált fehérjékhez nehezen fér hozzá az importin- α a foszfátcsoport negatív töltése miatt. Sok ilyen esetben a foszforilációért a ciklin dependens kináz 1 (CDK1) a felelős, ami leginkább a sejtciklus G_2/M fázisában lévő sejtek magjában aktív [21]. A CDK1 preferált foszforilációs konszenzus szekvenciája: (S/T)P(X)K, ami könnyen átfedhet az NLS első (P2) lizinjével, és a sok NLS-ben megtalálható (P1) prolinnal [19, 21]. A CDK1 kiemelt szereplője a sejtciklus lebonyolításának, példának okáért ez az enzim foszforilálja fel a maghártyát felépítő laminokat is, amely esemény a magmembrán felszakadását eredményezi az osztódás előtt.

Több CDK1 szubsztrátról leírt, hogy foszforilációjuk gátolja a magi lokalizációjukat (1. táblázat), azonban ezen felfoszforilált fehérje készlet sorsával ezidáig nem foglalkoztak a sejtciklus tükrében [23-34]. A mitózis során a maghártya felbomlik (prometáfázis) és a kromatin asszociált fehérjék kivételével a teljes magi proteom homogénen szétszlik az átmenetileg mag nélküli sejtben. A két új nukleusz létrejöttkor (telofázis), a magmembrán szorosan a kromatinhoz simulva szerelődik össze, kizárva a nem kromatin asszociált fehérjéket [35-37]. Az így kinnrekedt, felfoszforilált fehérje készlet sorsa tehát kérdéses.

A fenti jelenségre példa a dUTPáz (NLS-t tartalmazó magi fehérje, egyben CDK1 szubsztrát) amellyel csoportunkban részletesen foglalkoznak. Ez az enzim kiemelkedő szereppel bír a sejtbeli dUTP/dTTP nukleotid arány megfelelő értékének beállításában, ezáltal a genomi integritás megőrzésében [38]. Csoportunkban nemrég kimutatták, hogy osztódást követően a leánysejtekben, a CDK1 által foszforilált dUTPáz fehérjekészlet idővel defoszforilációs lépések révén az S fázisra ismét feltölti a magot, ezáltal a G_1 fázis alatt, csak időben késleltetve jut vissza a rendeltetett helyére



1. ábra

A dUTPáz lokalizációja a sejtciklus alatt.

Osztódás előtt a CDK1 felfoszforilálja a dUTPáz készletet, ami később a leánysejtekben kint reked a sejtmagból. A G_1 fázis során idővel defoszforilálódik a fehérje, ami megengedi, hogy a dUTPáz ismét feltöltse a nukleuszt. Hasonló NLS szerkezettel rendelkező CDK1 szubsztrátok, azonos sejtciklus függő viselkedést sejtetnek.

(1. ábra). A dUTPáz példája azt sugallja, hogy a CDK1 által végzett NLS közeli foszforiláció általánosságban véve befolyásolhatja a leánysejtek magi proteomjának összetételét. Ezért kezdtem el olyan további ismert CDK1 szubsztrátokat keresni, amelyek NLS-e hasonlít a dUTPáz szignáljához, de a foszforilációs esemény hatása még nem leírt (1. táblázat, harmadik blokk) [39-43].

A sejtmagba irányuló transzportra a cargo fehérje oligomerizációs állapota is hatással lehet. Ezen folyamatokat az irodalomban eddig csak kevésbé vizsgálták, pedig a sejtmagban számos oligomer fehérje is található (pl. SV40, nukleoplazmin, APC, dUTPáz) [44-46]. A nukleoplazmin fehérje, magi transzportja például pentamer formában hatékonyabb, mint monomer formában, mivel így a fehérje oligomerizációval több funkcionális NLS-re is szert tehet [46].

Amennyiben az oligomerizáció mellett foszforiláció is befolyásolja a fehérjék intracelluláris elhelyezkedését, az felveti a kérdést, hogy ha az oligomer NLS-einek csak egy része módosul foszforilációval, akkor annak hatása milyen mértékben érvényesül.

Célkitűzések

Munkám során két fő célt tűztem ki:

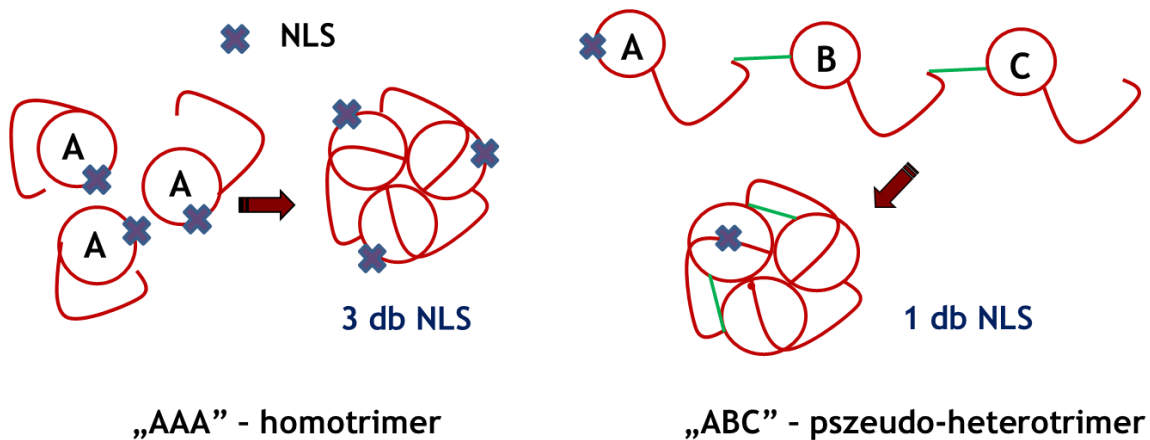
1. Általános séma megfogalmazása CDK1 szubsztrátok NLS közeli foszforilációjának magi transzportra gyakorolt hatásáról.

A potenciális szabályozás alá eső fehérjéket (p53, UBA1, UNG), fluoreszcens jelöléssel láttam el, majd foszforilációt mimikáló mutációkat hoztam rajtuk létre. Ezeket különböző emlős sejtvonalba transzfektálva vizsgáltam a konstruktok lokalizációját. A kísérletes eredmények, valamint az importin- α NLS peptid kristályszerkezetek alapján igyekeztem karakterizálni, hogy a foszforiláció pontosan milyen helyzetből képes az NLS funkcióját megváltoztatni, azaz fellelhető-e egy általánosan megfogalmazható törvényszerűség.

2. Az NLS-ük közelében foszforilálódni képes oligomer fehérjék magi transzportjának vizsgálata.

Az NLS-ük közelében CDK1 target szekvenciával rendelkező fehérjék között több olyan is található, amely oligomer formában van jelen sejtben, azaz több NLS-el rendelkező makromolekuláris komplexbe rendeződik. Ez vetette fel a kérdést, hogy amennyiben egy ilyen komplex funkcionális NLS száma megváltozik (például foszforiláció vagy más poszttranszlációs módosítások által) az vajon kihat-e a makromolekuláris komplex sejtbeli

elhelyezkedésére. A kérdés vizsgálatára a *Drosophila virilis* dUTPáz-t használtam fel, ami egy egyetlen NLS-el rendelkező, kovalensen kapcsolt pszeudo-heterotimer („ABC”) enzim, szemben az élővilágban általánosságban elterjedt homotrimer (három NLS-el bíró) formákkal. Géntechnológiai úton, az „ABC” formából készített „A” monomer forma a sejtben egy három aktív NLS-t hordozó homotrimerré áll össze, ezért ezek a fehérjék megfelelő modellt biztosítottak az eltérő NLS szám és transzport közötti kapcsolat vizsgálatára (2. ábra). Ennek érdekében különböző expressziós plazmidokba klónoztam az „A” és „ABC” géneket, majd emlős és rovar sejtvonalakba transzfektálva vizsgáltam a fúziós konstruktok lokalizációját. Az



2. ábra

A *Drosophila virilis* dUTPáz (modell fehérje) konstruktok sematikus rajza.

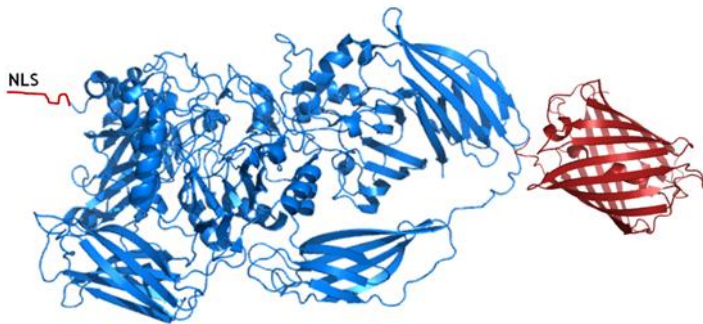
Az „A” fehérjét kódoló plazmidról átíródott monomerek a sejtben „AAA” homotrimerré kapcsolódnak össze, amely így három aktív NLS szignált hordoz. Ezzel körülbelül azonos méretű fehérje íródik át az „ABC” konstruktról (a *D. virilis* endogén dUTPáz formája) amely egy kovalensen, kapcsoló régiókkal összekötött pszeudo-heterotimert képez. Ez azonban csak egy aktív NLS szignált visel.

endogén, egy NLS-t tartalmazó pszeudo-heterotimer *D. virilis* dUTPáz sejtbeli elhelyezkedését szöveteken végzett immunhisztokémiával kívántam meghatározni. Az NLS számbeli különbség hatását továbbá kvalitatív (natív gélelektroforézis) és kvantitatív (izotermális titrációs mikroklorimetria - ITC) módszerekkel is vizsgáltam a különböző *D. virilis* dUTPáz és importin- α komplexek képződésének példáján.

Anyag és módszer

Plazmid konstrukciók létrehozása

Az UNG magi izoformájának (UNG2) ORF-ét tartalmazó plazmidot Prof. Salvatore Caradonnától kaptuk ajándékba, míg a p53 és UBA1 ORF-eket tartalmazó vektorokat az OriGene cégtől vásároltuk. A teljes fehérje-DsRed fúziós konstruktokhoz az UBA1-nek és az UNG2-nek megfelelő génszakaszokat PCR-el felamplifikálva a pDsRed-M-N1 vektor XhoI/KpnI helyeire klónoztuk. A p53 ORF-ét a pDsRed-M-C1 plazmid XhoI/BamHI helyeire emeltük be. A plazmidokat konvencionális technikával XL1-Blue sejtekbe transzformálva szaporítottuk fel és NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) kittel tisztítottuk ki. Az „E” és



3. ábra

Az NLS-ek fehérjekontextus független vizsgálatára létrehozott riporter konstruktséma sematikus modellje.

Kékekkel a β -galaktozidáz (PDB ID: 1F49), pirossal a DsRed (PDB ID: 2VAD) fluoreszcens marker egymáshoz illesztett kristályszerkezete látható.

„Q” mutánsokat a fent készített konstruktokból helyspecifikus mutagenézissel hoztuk létre, a QuickChange metodikát alkalmazva (Stratagene).

A β -galaktozidáz-DsRed riporter rendszer létrehozásánál a start kodont nélkülöző β -galaktozidáz gént szintén a pDsRed-M-N1 vektorba, a KpnI/EcoRI helyekre klónoztuk, miután az ORF-ét a pCAUG vektorból PCR-rel amplifikáltuk

fel. Az egyes NLS szegmenseket kódoló oligókat (p53, UBA1, UNG, Swi6, SV40) komplementer ssDNS formájában az Eurofins MWG Operontól rendeltük, majd ezeket egymással anneláltatva „sticky-end” végződésű dsDNS oligókhoz jutottunk, amelyek végei pontosan megfeleltek az NheI/EcoRI restrikciós endonuklázok hasítóhelyeinek. A β -galaktozidáz-DsRed vektor ezzel identikus helyeire klónoztuk ezen start kodont is tartalmazó NLS oligókat. A különböző konstruktokat, az adott mutációkat már tartalmazó ssDNS oligókból kiindulva készítettük el.

A *Drosophila virilis* dUTPáz „A” és „ABC” géneket tartalmazó pET-15b plazmidok Horváth Andrásról és Benedek Andrásról származnak, az egér importin- α Δ IBB-t egy pET-30a plazmidban Bostjan Kobe csoportjától kaptuk. Az emlős expressziós rendszer

előállításához ezeket a géneket mind a pEGFP-N1 és a pDsRed-M-N1 vektorok SmaI/KpnI helyeire is átklónoztuk PCR segítségével. Az így elkészült konstrukciókból az „A-EGFP”, „ABC-EGFP” konstruktokat a pIZ/V5-His rovar expressziós vektor NotI/KpnI helyeire emeltük be. Az elkészített plazmidok helyességét minden esetben szekvenáltatással ellenőriztük le.

Sejtkultúrák fenntartása és transzfekciója

Az emlős (HeLa, COS-7, MCF-7, NIH-3T3 és 293T-HEK) sejtek DMEM/F12 HAM (Sigma) tápban, penicillin és streptomycin antibiotikumok mellett (50-50 µg/ml; Gibco), 10% FBS (Fetal Bovine Serum, az NIH-3T3 sejteknél Fetal Calf Serum; Gibco) hozzáadásával voltak fenntartva. Az Sf9 és a Schneider S2 rovar sejteket Schneider Insect Medium-ban (Sigma) nőttek; antibiotikumokat és szérumot ugyan abban a koncentrációban használtunk, mint az emlős sejteknél. A plazmidokat FuGENE HD (Roche) transzfekciós reagenssel, a gyártó protokollja szerint juttattuk a sejtekbe. A konstruktok lokalizációját egy Leica DM IL LED fluoreszcens mikroszkópon és egy Zeiss 710 LCSM konfokális mikroszkópon vizsgáltuk.

Immunhiszto- és immuncitokémia

A *D. virilis* és a *D. melanogaster* ovárium, diszkusz, nyálmirigy és testis szöveteinek kipreparálását Horváth András és Zagyva Imre végezte. A fixáló elegy 50 % heptánt és 50 % PEM-et (4 % PFA, 2.5 % Tween-20, 100 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH=6.9) tartalmazott, ebben 1 órán keresztül rázódtak a szövetek. Ezt három 10 perces mosás követte (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween-20, pH=7.4). Mosás után 4 órán keresztül blokkoló/1-ben (1.5 % BSA-t, 250 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, 1 % Triton-X 100, 0,001 % NaN₃, 2.5 % FBS, 2.5 % FGS, PBS-ben oldva) rázódtak a minták. Ezután elsődleges anti-lamin ellenanyaggal (1:400, DSHB) és anti-dUTPáz ellenanyaggal (1:10000) 4°-on overnight festettünk blokkoló/2-ben (2.5 % FBS, 2.5 % FGS, 1 % BSA, 0.01 % Tween-20, 0.1 % Triton-X 100, 0.001 % NaN₃, PBS-ben oldva). Ezt követően antitest mentes blokkoló/2-ben 24 órán át rázódtak a minták 4°-on. A lamin jelölés láthatóvá tételéhez anti-egér Alexa 633 konjugátumot (Molecular Probes), míg dUTPáz-hoz anti-nyúl Alexa 488 konjugátumot (Molecular Probes) használtunk blokkoló/2-ben, 1000 x hígításban, 2 óra inkubációs időt alkalmazva, szobahőmérsékleten. Blokkoló/2-ben történő intenzív mosást követően a sejtmag és aktin festést PBS-ben oldott 1 % BSA, 0.05 % Triton-X 100, 0.02 % NaN₃ mellett DAPI-

val (0.1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) és phalloidin-TRITC oldattal (0.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) végeztük. Mosást követően FluorSave (Calbiochem) beágyazóban fedtük le a szöveteket.

A Schneider S2 sejteket transzfekció és festés előtt Concanavalin-A-val (0.5 mg/ml) és poli-L-lizinnel (0.01 %) kezelt óráüvegekre kerültek, hogy jobban vizsgálható, szétterült sejteket kapjunk. A fixálást 4% PFA-ban 15 percig, a permeabilizálást 0.1 % Triton-X 100-ban 10 percig végeztük. Kétórányi blokkolás (2.5 % FBS, 2.5 % GS (Goat Serum), 1 % BSA, 0.002 % NaN_3 , PBS-ben oldva) után az elsődleges lamin ellenanyagot tartalmazó oldatban (400 x hígítás az előbbi blokkolóban) 4°C-on overnight inkubálódtak a sejtek. Ezt követően ismét blokkolóban mostuk a sejteket 4 órán át, majd a másodlagos anti-egér Alexa 633 konjugátumot (1:1000) két órán keresztül hagytuk sötétben a mintán. Az aktin és a sejtmag festés, valamint a lefedés a szöveteknél alkalmazott módszerhez hasonlóan történt. A kontrollként használt *D. melanogaster* YFP-dUTPáz fúziós konstruktok (magi és citoplazmás izoforma) Merényi Gábortól származnak.

A D. virilis dUTPáz „A” és „ABC” valamint egér importin- α AIBB expresszió

Az „A”-t és „ABC”-t tartalmazó pET-15b vektorokat és az importint tartalmazó pET-30a vektort konvencionális technikával Rosetta (DE3) pLys törzsbe transzformáltuk, majd antibiotikumos (Rosetta sejtek szelekciójára 33.9 $\mu\text{g/ml}$ klóramfenikol; dUTPáz-oknál 50 $\mu\text{g/ml}$ karbenicillin; importinnál 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicin) plétre szélesztettük. A plétről indított 5 ml overnight előkultúrral inokulált 500 ml tápoldatot 37 °C-on növesztettük tovább. $A_{600}=0.5$ optikai denzitás elérésekor 0.6 mM IPTG-vel (izopropil- β -D-1-tiogalakto-piranozid) indukáltuk az expressziót (25 °C-on), és öt óra elteltével centrifugálással (20 perc, 1380 x g, 4°C) ülepitettük le a sejteket, majd a pellet -80 °C-on állt felhasználásig. A sejtek feltárását lízis pufferben (50 mM TRIS, pH=8.0; 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 5 mM benzamidin, 1 db EDTA mentes proteáz gátló tabletta (Roche), 10 mM β -ME (β -merkaptotetanol), 0.1 mg/ml lizozim, 0.1 mg/ml DNáz, 0.01 mg/ml RNáz A) való potterezés után szonikálással segítettük elő. Az importinnál szonikálás helyett fecskendővel szuszpendálva, mechanikai nyíróerőt alkalmazva tártuk fel a sejteket.

Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával és géliszűréssel

A Ni-NTA oszlopokat a fenti lízispufferekben ekvilibráltuk, majd a mintákat 15 mM imidazol és 1 mM MgCl_2 hozzáadása után vittük oszlopra. Több lépcsős mosásokkal igyekeztünk eltávolítani az oszlopra aspecifikusan kikötődött fehérjéket. Először „low salt” pufferrel (dUTPáz-oknál: 50 mM HEPES, pH=7.5, 30 mM KCl, 5 mM β -ME; importinnál: 20

mM HEPES, pH=7.0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol, 5 mM β -ME), majd „high salt” puffert (dUTPáz-oknál: 50 mM TRIS, pH=7.5 300 mM KCl, 5 mM β -ME; importinnál: 20 mM HEPES, pH=7.0, 1M NaCl, 25 mM imidazol, 5 mM β -ME). Harmadik mosásként 50 mM imidazol tartalmazó „low salt” puffert használtunk a dUTPáz-okhoz. Az elúciós puffer összetétele dUTPázoknál: 500 mM imidazol, 50 mM HEPES, pH=7.5, 30 mM KCl, 10 mM β -ME, 0.1 mM PMSF, 1 db EDTA mentes proteáz gátló tabletta (Roche). Az importin elúciója az alábbi pufferben történt: 125 mM imidazol, 20 mM HEPES, pH=7.0, 500 mM NaCl, 10 mM β -ME, 0.1 mM PMSF, 1 db EDTA mentes proteáz gátló tabletta (Roche). Gélszűrés előtt a mintákat overnight dializáltuk, a puffer összetétele dUTPázoknál: 20 mM HEPES, pH=7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME; importinnál: 20 mM TRIS, pH=7.8, 125 mM NaCl, 10 mM β -ME.

Gélszűréshez Superdex 200-as oszlopot használtunk, GE Healthcare Äkta Explorer készülékben. A gélszűrés az alábbi pufferekben történt: dUTPázoknál (20 mM HEPES, pH=7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME, 2mM DTT (ditiotritol) és 5 % glicerin); importinnál (20 mM TRIS, pH=7.8, 125 mM NaCl, 10 mM β -ME, 2mM DTT és 5 % glicerin).

A fehérjék tisztítását követően SDS-PAGE-n ellenőriztük a minták homogenitását, ami minden esetben nagyobb volt, mint 95%.

Natív Poliakrilamid Gélelektroforézis

Natív-PAGE-hez 10 % akrilamid-os, a fehérjék izoelektromos pontjából adódóan pH=9.0-es, elválasztó gél használtunk, a tömörítő gél 4 %-os, pH=7.8-as volt. A minták 200 V-on futottak, jégben.

ITC (izotermális titrációs mikrokolorimetria)

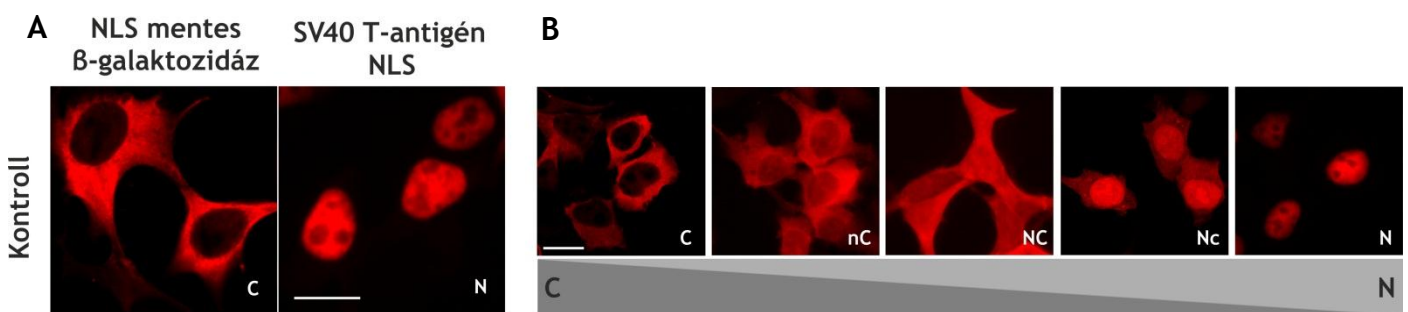
A mérést 20°C-on Microcal ITC₂₀₀ készülékben végeztük. A dUTPázok és az importin közös pufferben való overnight dialízist (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM β -ME, pH=7.5) követően került a műszerbe. A cellában 45 μM importin, a fecskendőben 460 μM dUTPáz volt jelen, amiből 1.5 μl -es injektálásokkal történt a titrálás. Kontroll kísérletként a cellában lévő dialízis puffert is titráltuk dUTPázokkal, az így kapott oldódásból adódó hő változás mértékét később levontuk az adatsorokból. A MicroCal Origin programban található egyféle kötőhelyet leíró függvényt használtuk illesztéshez. Az első mérési pontot elhanyagoltuk, mert az úgyis diffúziós hibával lett volna terhelt. A koncentrációkat homotrimerre („AAA”), illetve pszeudo-heterotrimerre („ABC”) számoltuk.

Eredmények

A szignál közeli foszforiláció hatása az NLS aktivitására

Elsőként, már ismert, NLS közeli foszforilációnak kitett fehérjék (p53, UBA1, UNG) esetében kívántuk megvizsgálni a foszforiláció esetleges lokalizációra kifejtett hatását. Ennek érdekében az egyes fehérjéket egy fluoreszcens jelzőfehérjével (DsRed-monomer) kötöttük össze kovalensen, és vizsgáltuk azok intracelluláris elhelyezkedését. A kísérleteket számos különböző sejtvonalban (HeLa, COS-7, MCF-7, NIH-3T3 és 293T-HEK) elvégeztük, annak kiderítésére, hogy az egyes vonalak között található-e különbség a fehérjék lokalizációjának szempontjából, azaz, hogy a különböző genotípusú háttér mennyire befolyásolja az eredményeket. Jelen dolgozatban a 293T-HEK sejteken kapott eredményeket mutatom be, mivel az egyes sejtvonalak között különbség nem volt tapasztalható.

A fehérjék lokalizációjának fenotípusos jellemzésére egy standard jelölésrendszert készítettünk és ehhez a skálához viszonyítottuk az egyes konstrukciók lokalizációját (4. ábra/B). A foszforiláció hatásának vizsgálatára az egyes fehérjékből foszforilációt mimikáló mutánsokat hoztunk létre (5. és 6. ábra). Ilyenkor az NLS közeli, a sejtben CDK1 által foszforilálódni képes szerin aminosavat glutaminsavra cseréltük. Ez a glutaminsav a foszforilált állapotban lévő szerin (foszfo-szerin) molekulát képes mimikálni, mivel szintén negatív töltésű, illetve méretében és alakjában is hasonló. Töltéssel nem rendelkező, de



4. ábra

A riporter rendszer validálása 293T-HEK sejtekben.

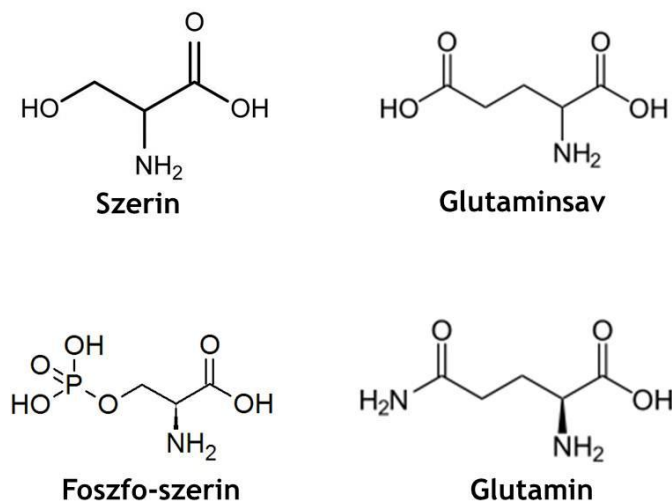
A/ Kontroll kísérletek a β-galaktózidázt tartalmazó riporter konstrukttal.

Látszik, hogy az NLS mentes β-galaktózidáz nagy mérete lévén nem képes átjutni a magpórusokon, ezért citoplazmatikus elhelyezkedésű. Ezzel szemben az SV40 T-antigén NLS-t hordozó β-galaktózidáz már kizárólag magi elhelyezkedést mutat.

B/ Lokalizáció jellemzésére alkalmazott nomenklatura.

A teljesen nukleáris (N), illetve a teljesen citoplazmatikus (C) lokalizáció közötti átmenetet a skála szerinti betűkódok jelzik.

azonos méretű aminosav a nem foszforilálható glutamin. Ezen izosztérikus kontroll használata azért volt célszerű, hogy megbizonyosodhassunk arról, hogy az esetlegesen tapasztalt változás, ami a szerin glutaminsavra történő lecserélésekor lép fel, valóban csak a negatív töltés hatásának tudható be, nem pedig a megnövekedett oldallánc hosszának.



5. ábra
A foszforilációt mimikáló glutaminsav és izosztérikus kontrollja.

A foszforilált állapotban lévő szerin (foszfo-szerin) molekula negatív töltéssel bír, ennek mimikálására használható a szintén negatív töltésű, méretben és alakban hasonló glutaminsav. Töltéssel nem rendelkező, azonos méretű aminosav a nem foszforilálható glutamin. Ezt izosztérikus kontrollnak tekinthetjük, mivel azonos mérete, de töltés hiánya miatt bizonyítja, hogy a negatív töltés az, ami befolyásolja a lokalizációt.

A plazmid transzfekciós kísérletek mutatják, hogy az általunk vizsgált teljes fehérje-DsRed konstruktok foszforilációt mimikáló, glutaminsavas „E” mutánsai nem változtatták meg a lokalizációt, a fehérjék mind a sejtmagba vándoroltak (7. ábra). E megfigyelés kapcsán elkezdtük alaposabban összehasonlítani a három fehérje NLS-eit (UNG, UBA1, p53) a dUTPáz NLS-ével, keresve, hogy vajon itt látható-e olyan különbség, ami magyarázatot adhat arra, hogy a dUTPáz esetén miért tapasztalható ilyen drasztikus hatás, míg a vizsgált három fehérjénél viszont nem. A kérdés megválaszolásához segítségünkre voltak a kollaborációs partnereink által megoldott kristályszerkezetek, amelyekben a dUTPáz vad típusú és glutaminsavas NLS peptidével kristályosított importin- α -t lehet tanulmányozni (8. ábra). Ezen látható, hogy a foszforilációt mimikáló glutaminsavat tartalmazó NLS és a vad típusú NLS hasonló konformációt vesz fel az importin- α kötőzsebében. A bevitt negatív töltés hatására azonban az NLS P3-as pozícióban elhelyezkedő argininja kifordul az importin- α -án található kötőzsebéből. Az NLS arginin és az importin- α P3-as kötőhelyének aszparaginja között megszűnik az a kapcsolat, ami nagyban felelős a komplex összetartásáért (8. ábra/B). A kapcsolat gyengülését gyakorlatilag egy intrapeptidális versengés eredményezi, mivel a foszforilációval vagy mutagenezissel bekerült P-1-es pozíciójú negatív töltés egy köztes

víz-molekulán keresztül kifordítja eredeti helyéről a P3-as arginint. Összességében, a dUTPáz esetére elmondható hogy a P-1-es pozícióból a negatív glutaminsav elrontja az importinnal való kapcsolatot, ezáltal gyengítve a sejtmagba jutást.

DUT S11E:	¹¹ E PSKRARPA ¹⁹
DUT S13E:	¹¹ SP E KRARPA ¹⁹
UNG S14E:	¹² SP E PARKRHAP ²²
UNG S12E & S14E:	¹² E P E PARKRHAP ²²
UNG S14E & A16Δ:	¹² SP E P A RKRHAP ²²
UNG K18N:	¹² SPSPARNRHAP ²²
UBA S4E:	⁴ E PLSKKRRV ¹²
UBA S4E & L6Δ:	⁴ E P L SKKRRV ¹²
p53 S315E:	³¹⁵ E PQPKKKPL ³²³
p53 S315E & 317QΔ:	³¹⁵ E P Q PKKKPL ³²³
Swi6 S160E & A162ins:	¹⁶⁰ E P A LKKLKI ¹⁶⁸
Swi6 S160E:	¹⁶⁰ E PLKKLKI ¹⁶⁷

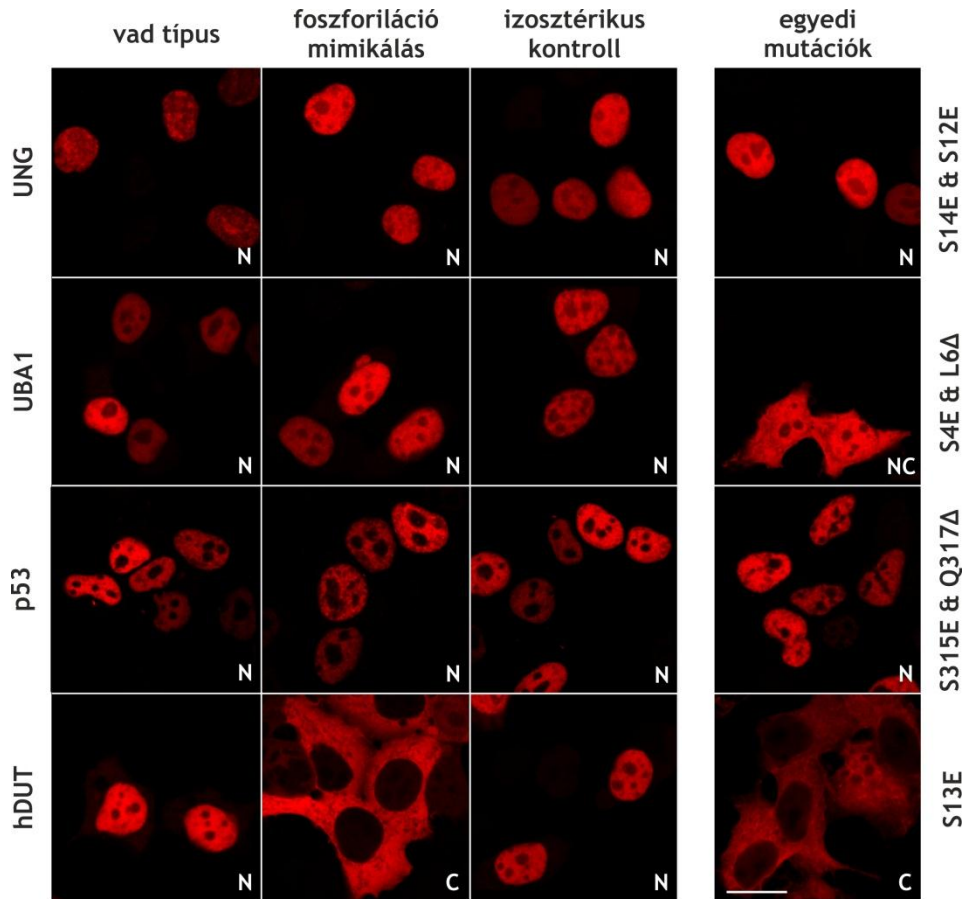
6. ábra

**A dolgozatban használt
valamennyi konstrukt NLS-
einek aminosav szekvenciája.**

Bordóval a foszfo-szerin mimikálására bevitt glutaminsav, **zöld**del a delécióval eltávolított, **kék**kel pedig az inszercióval bevitt aminosavak vannak jelölve. Aláhúzással az NLS pozitív töltésű aminosavai vannak jelölve, ezek a legkritikusabbak egy NLS működéséhez. UNG K18N esetén félkövérrel az NLS pozitív blokkjának elroncsolása végett bevitt mutáció látható.

Ezt az információt összevetettük az irodalomban található importin- α kötőzsebek egyes aminosav preferenciáira vonatkozó adataival és más NLS/importin- α kristályszerkezetekkel [12]. Ezek alapján egymás alá rendeztük a különböző NLS-eket, mintegy beillesztve őket a kötőárokba. A táblázatból látható, hogy a vizsgált három fehérje esetében a foszforilálódni képes szerin az NLS első (és legkritikusabb) lizinjétől (K) egy aminosavval távolabb helyezkedik el, mint a dUTPáz esetében (2. táblázat; 20. oldal). Ezután létrehoztunk olyan egyedi deléciós mutációkat az UBA és p53 fehérjék NLS szignáljain, amikkel a dUTPáz szignál szekvenciájához hasonlóbbá tettük őket. Ez a hasonlóság annyit jelent, hogy a glutaminsav ugyanolyan távolságra került a pozitív klaszter első lizin tagjától (ami a P2-es zsebbe fekszik bele), mint ahogy az a dUTPáz NLS-ében megfigyelhető (2. táblázat). Az így feltételezhetően P-1-es kötőzseb pozícióba került glutaminsavas UBA1 és p53 mutánsok közül csak az UBA1 S4E & L6Δ mutáns mutatott lokalizációbeli változást: csak részlegesen transzportálódott a nukleuszba, amit a diffúz elhelyezkedés jelez (7. ábra). A dUTPáz 13-as szerinje endogénen nem foszforilálódik, azonban az S13E mutánsáról már csoportunk korábbi munkájából ismert, hogy azonos hatást képes kiváltani, mint az S11E mutáns, azaz csökkenti a magi importot (7. ábra). Az UNG esetében az egyedi mutáció (UNG S12E & S14E) egy dupla glutaminsavas mutánst jelent. Az irodalomból ismert, hogy ez az S12-es pozíció is CDK1 foszforilációs hely, ezért ennél a mutánsnál ezt az NLS-től két

aminosav pozícióval távolabbi szerint is glutaminsavra cseréltünk. Ez a mutáció azonban nem okozott lokalizációbeli változást (7. ábra).



7. ábra

A teljes cargo fehérjével végzett lokalizációs kísérletek eredményei 293T-HEK sejtekben.

Az alsó sorban a dUTPázra már korábban leírt foszforiláció által befolyásolt lokalizációs mintázat látható. Az S13 szerinről nem leírt, hogy foszforilálódik a sejtben, ennek ellenére az ebbe a pozícióba bevitt glutaminsav is meggátolja a magi importot. A három vizsgált fehérjén (UNG, UBA1, p53) a foszforiláció mimikálás nem váltott ki citoplazmatikus retenciót. A p53 és az UBA1 esetében a foszforilált pozíciókat egyedi deléciós mutációkkal elmozdítottuk az NLS pozitív klaszteréhez képest, ezáltal a dUTPáz NLS-éhez hasonlóbbá tettük azok NLS-eit (2. táblázat). A p53 ilyen egyedi mutációkkal sem záródott ki a magból, az UBA1 S4E & L6Δ mutáns viszont csak gyengébben tudott a magba transzportálódni, ami arra utal, hogy a foszforiláció csökkentette a sejtmagi importját. Az UNG S12E & S14E egy dupla glutaminsavas mutáns, amely így sem záródott ki a sejtmagból. A mérce 20 μ m.

Az előző, teljes fehérjét alkalmazó kísérletsorozatban az eredményeket számos faktor befolyásolhatta: például a fehérjéken található másodlagos NLS szignálok importot erősítő hatása, illetve a fehérjék bármely részéhez kötődhetnek kölcsönható partnerek, melyek szintén befolyásolhatták a lokalizációt. Az ilyen hatások kiküszöbölésére létrehoztunk egy olyan fluoreszcens riporter modellt, ami lehetővé tette, hogy az NLS-eken végbement foszforiláció lokalizációra kifejtett hatása önállóan legyen tesztelhető. Ehhez egy olyan nagyméretű inert fehérjéket kerestünk, amelyek funkcionális NLS hiányában, a méretükből adódóan kizáródnak a sejtmagból, tehát csak a rájuk kapcsolt NLS hatására léphetnek be a magba. Továbbá az is kritérium volt, hogy ezeknek a makromolekuláknak ne legyen emlős sejtekben ismert kölcsönható partnerük, ami befolyásolhatná lokalizációjukat. Erre a célra több különböző fehérjét kipróbáltunk (Piruvát kináz 1-es és 2-es izoformáját), de többek között aggregációs problémák miatt ezek nem működtek megfelelően. Végül az *Escherichia coli* β -galaktozidáza bizonyult a legalkalmasabbnak (3. ábra). A modell használhatóságát bizonyítja, hogy a közel 110 kDa körüli NLS mentes β -galaktozidáz-DsRed fúziós konstrukt kizárólag a citoplazmába, míg a SV40 T-antigén virális fehérje NLS-ét tartalmazó β -galaktozidáz-DsRed kontroll pedig a magba lokalizált (4. ábra/A).

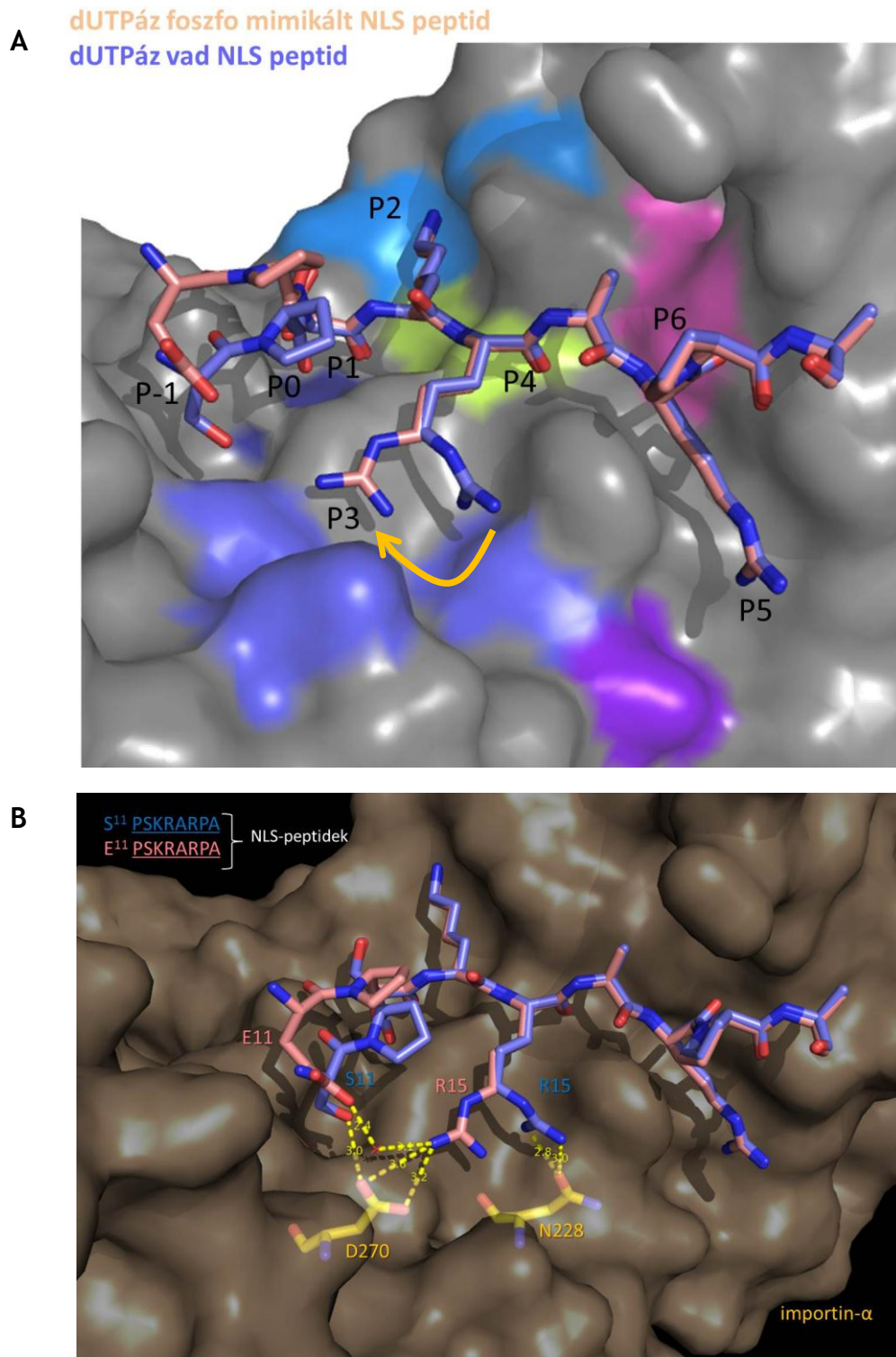
Az alábbi kísérletekben ezen β -galaktozidáz-DsRed konstrukció elé kapcsoltuk a különböző fehérjék vad típusú és glutaminsavas mutáns NLS szegmenseit. Kontrollként a Swi6, sejtciklust szabályozó élesztő fehérjét használtuk, mivel a Swi6-ról az irodalomban már igazolták, hogy követi a fent említett, dUTPázra jellemző általános foszforiláció függő lokalizációs mintázatot (1. ábra). A Swi6 NLS-e a dUTPáz-éhoz hasonló elrendeződéssel képzelhető el az importin- α kötőárkában (2. táblázat), azaz a foszforiláció a P-1-es pozícióban feltételezhető. Ezért nem volt meglepő, hogy a Swi6 foszforilációt mimikáló NLS szegmense citoplazmatikus lokalizációt eredményezett (9. ábra).

A p53 és az UBA1 NLS konstruktok a teljes fehérjéken megfigyelt eredményekkel azonos lokalizációs mintázatot mutatattak: azaz a p53-ra nem volt hatással a foszforiláció mimikálás, az UBA1 importját viszont részlegesen gátolta ha a glutaminsavat a P-1-es pozícióba helyeztük el (9. ábra). Az UNG-ról ismert, hogy gyenge NLS-el rendelkezik [47], a teljes fehérjén végzett lokalizációs vizsgálatokkor a konvencionális NLS-en kívül a fehérje másodlagos magi transzportért felelős szekvenciái is segíthették a teljes mértékű magi lokalizációt (7. ábra). Itt, az önmagában NLS szegmenst vizsgáló kísérletekben azonban a riporter konstrukt csak a tesztelni kívánt szegmens (UNG konvencionális NLS) segítségével

juthat be a sejtmagba, ami ebben az esetben nem bizonyult elegendőnek a teljes magi importozáshoz; ennek tudható be a főként magon kívüli lokalizáció. Vegyük azonban észre, hogy a vad típusú UNG NLS „nC” fenotípust mutat, azaz a citoplazma mellett bizonyos mértékben a magban is megtalálható a fehérje (9. ábra). Érdekes, hogy a foszforilációt mimikáló NLS (UNG S14E) a vad típusnál intenzívebb jelet adott a sejtmagban.

Az UNG S14E & A16del mutánsnál a negatív töltés a P-2 helyről a P-1 pozícióba került, ami viszont már egyértelműen gyengítette az NLS-t, még a vad típushoz képest is (9. ábra). Ez tovább erősíti a P-1-es pozícióban található negatív töltés importot gátló szerepét. Az UNG K18N mutánsa nem mimikál foszforilációt, ebben az NLS funkcióját biztosító pozitív blokk egyik kritikus aminosava (P2 pozíciójú lizin) van elrontva, ami teljes mértékben elrontja a magi lokalizációt (9. ábra).

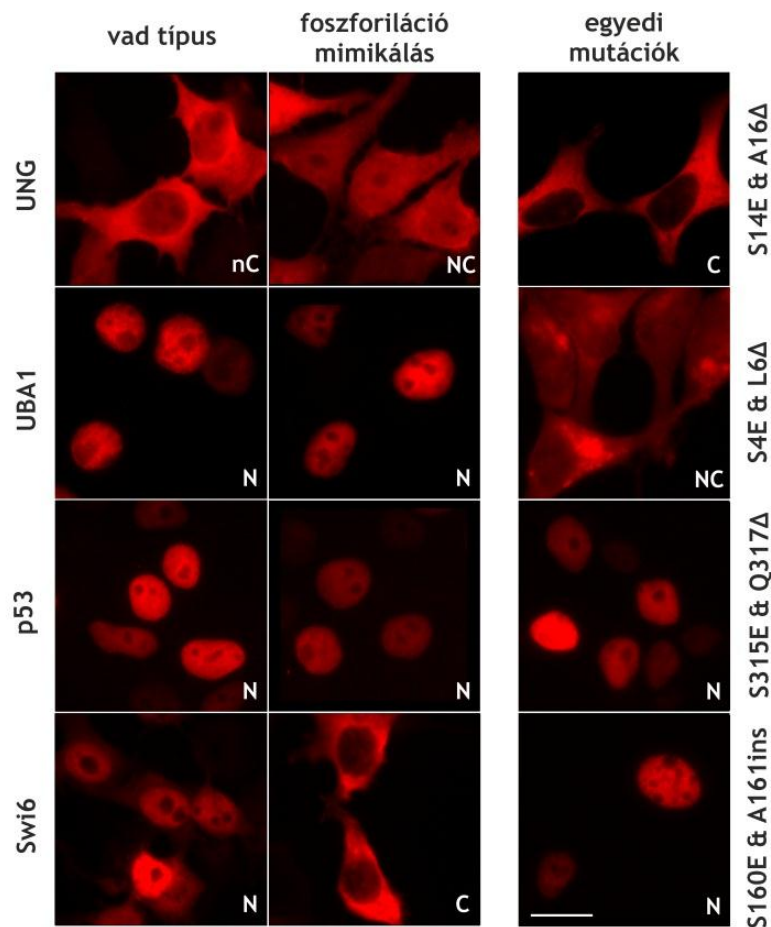
A diszkusszióban tárgyalt táblázat (2. táblázat) tanulságai alapján később készítettük el a Swi6 A160ins mutánst (6. ábra). A Swi6 A160ins esetében kíváncsiak voltunk arra, hogy a P-1-es pozícióból az NLS-től távolabbi P-2-es pozícióba elmozdítva a negatív töltést, vajon megváltozik-e a konstrukció lokalizációja. Kosugi és munkatársai importin- α peptidinhibitorokkal végzett kísérleteik alapján feltételezték, hogy a P-2 pozícióban a negatív töltésű aminosavak serkenthetik a sejtmagi importot [48]. A Swi6 A160ins mutánsban az alanin inszerció hatására a foszfo-szerint mimikáló glutaminsav a P-1 pozícióból átkerült a P-2 pozícióba, ami azt eredményezte, hogy a konstrukció visszanyerte a vad típushoz hasonló sejtmagi lokalizációt (menekítés). Sőt, ez a P-2 pozícióba került negatív töltés a vad Swi6 NLS-nél is magibb mintázatot okozott (9. ábra). Ez magyarázatot adhat arra a jelenségre is, amit az UNG vad és foszforiláció mimikáló NLS-énél (S14E) tapasztaltunk, azaz, hogy az S14E mutáns magibb lokalizációt mutatott, mint a vad típusú UNG NLS. Az S14E-nél a negatív töltés a 2. táblázat alapján a P-2-es pozícióban van, csakúgy, mint a Swi6 A160ins-nél. Ez a két jelenség a P-2 pozícióba került negatív töltés magi transzportot serkentő hatását erősíti meg.



8. ábra

A foszforiláció sejtmagi import gátló hatásának szerkezeti háttér.

Mindkét ábrán a humán dUTPáz **vad típusú** és **foszforilációt mimikáló** (S11E) NLS peptideinek importin- α -val kristályosított térszerkezetei egymásra illesztve láthatóak. Szürke illetve barnás színű az importin- α NLS kötőárkának felülete. Az „A” ábrán az importin- α felületén különböző színezéssel az egyes kötőzsebek láthatók. Az ezekbe kapcsolódó egyes NLS aminosavakat a „P” számozás jelöli, a már ismert legkritikusabb P2-es lizin aminosavhoz képest. A **foszforilációt mimikáló** peptidben az amúgy endogénen foszforilálódó, P-1-es pozíciójű szerin aminosav glutaminsavra van cserélve. A glutaminsav negatív töltésének hatására egy itt nem jelölt víz molekulán keresztül a P3-as arginin oldallánc elmozdul (**sárga nyíl**) eredeti pozíciójából. Ennek hatására az importin- α NLS kapcsolat affinitása annyira lecsökken, hogy a cargo importja nem képes megvalósulni. A „B” ábrán a kapcsolat megszűnésének molekuláris mechanizmusa látható. A P3-as kötőzseb N228-as aszparaginja a vad típusú NLS-ben a P3-as arginint koordinálja. A P-1-es negatív töltés hatására azonban (egy víz molekulán közvetítésével) a P3-as arginin elfordul eredeti pozíciójából.



9. ábra

Az NLS és a foszforiláció önálló vizsgálata a β -galaktozidáz riporter konstrukttal.

Az UBA1 és p53 fehérjéknek a teljes cargo-val kapott eredményekkel azonos a lokalizációjuk: a p53-nál nincs hatása a foszforiláció mimikálásnak, az UBA1 esetében viszont gyengíti a magi importot. Érdekes, hogy az UNG NLS foszforiláció mimikáló mutánsa (S14E) erősebben transzportálódott a magba, mint a vad típus (nC vs. NC lokalizáció). Az UNG S14E & A16Δ mutánsnál a negatív glutaminsav a dUTPáznál leírt pozícióba (P-1) került, és így teljes mértékben a citoplazmába lokalizált a konstrukció. A Swi6 fehérjéről az irodalomban leírt, hogy a dUTPáz-hoz hasonlóan szabályozódik, és 2. táblázatból az is látható, hogy a dUTPázhoz hasonlóan a P-1 pozíciójában van a foszforilálódó szerin aminosav. A Swi6 S160E & A162ins mutánsnál a negatív töltést „kitöltük” a P-1 helyből, ezáltal maradéktalanul a magba transzportálódott. A mérce 20 μ m.

	NLS az importin- α fő kötőárkában									Lokalizáció	
	P-2	P-1	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	NLS peptid	Teljes fehérje
UBA WT	S	P	L	S	K	K	R	R	V	N	N
UBA S4E	E	P	L	S	K	K	R	R	V	N	N
UBA S4E & L6 Δ		E	P	S	K	K	R	R	V	NC	NC
UNG WT	S	P	A	R	K	R	H	A	P	nC	N
UNG S14E	E	P	A	R	K	R	H	A	P	NC	N
UNG K18N	S	P	A	R	N	R	H	A	P	C	-
UNG S14E & A16 Δ		E	P	R	K	R	H	A	P	C	-
Swi6 WT		S	P	L	K	K	L	K	I	Nc	-
Swi6 S160E		E	P	L	K	K	L	K	I	C	-
Swi6 S160E & A161ins	E	A	P	L	K	K	L	K	I	N	-
DUT WT		S	P	S	K	R	A	R	P	NC	N
DUT S11E		E	P	S	K	R	A	R	P	C	C
DUT S13E		S	P	E	K	R	A	R	P	-	C
SV40		T	P	P	K	K	K	R	K	Ismert CDK1 szubsztrátok, ahol az NLS közeli foszforiláció kihat a lokalizációra	
CDC6		S	P	R	K	R	L	G	D		
Swi6		S	P	L	K	K	L	K	I		
Swi5		S	P	R	K	R	G	R	P		
CDH1		S	P	R	K	P	T	R	K		
MCM3		S	P	K	K	R	Q	K	V		
Yen1		S	P	I	K	K	S	R	T		
Psy4		T	P	R	K	R	K	P	T		
Msa1 I		S	P	N	K	R	R	L	S		
Msa1 II		T	P	T	K	K	S	S	T		
Pds1		S	P	T	K	R	L	H	T		
Acm1		S	P	S	K	R	R	S	Q		

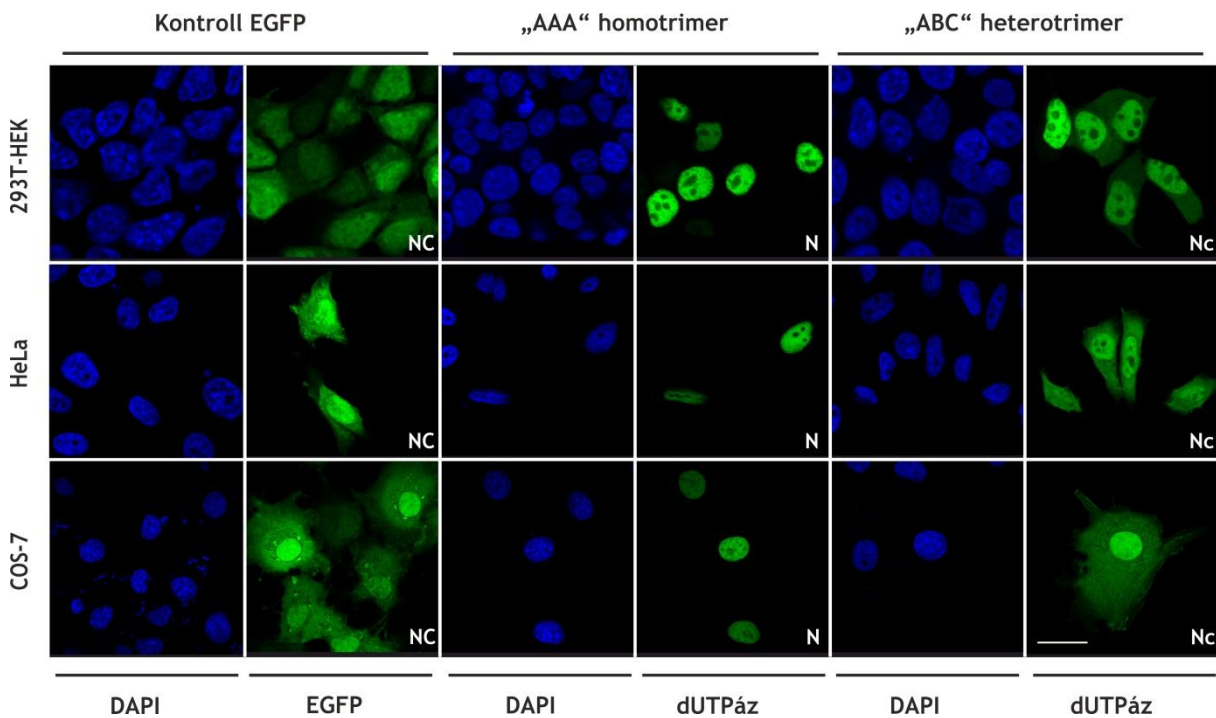
2. táblázat

A használt konstruktok NLS-einek szekvenciája, az importin- α kötőzsebébe való illesztés szerint ábrázolva.

Kísérleteink egyértelműen mutatják, hogy a P-1 pozícióban a negatív töltés (glutaminsav=E) minden vizsgált esetben gyengíti a magi transzportot. Továbbá, az UNG esete mutatja, hogy ugyanez a negatív töltés a P-2 pozícióból elősegítheti a magba jutást. Ezt bizonyítja az Swi6 S160E & A162ins mutáns is. Számos az irodalomban leírt, foszforilációval elrontott magi lokalizációjú fehérje is a megfogalmazott sémával azonos módon szabályozódik, ezeket a táblázatba illesztve minden esetben látható, hogy a P-1 pozícióban található a foszforilálódó szerin aminosav.

*NLS finomszabályzás vizsgálata *Drosophila* dUTPáz modellen*

Mivel a fent vizsgált fehérjék közül több is oligomer formában van jelen a sejtben, így kérdéses, hogy egy ilyen komplexben az aktív (foszforilálatlan) és inaktív (foszforilált) NLS-ek közötti arány nyújthat-e további lehetőséget a lokalizáció finomszabályzására. A *Drosophila virilis* dUTPáz egyetlen funkcionális NLS-el rendelkező „ABC” pszeudo-heterotrimer és az abból mesterségesen létrehozható, három funkcionális szignált hordozó „AAA” homotrimer formája megfelelő modellrendszert biztosított a kérdés vizsgálatához.



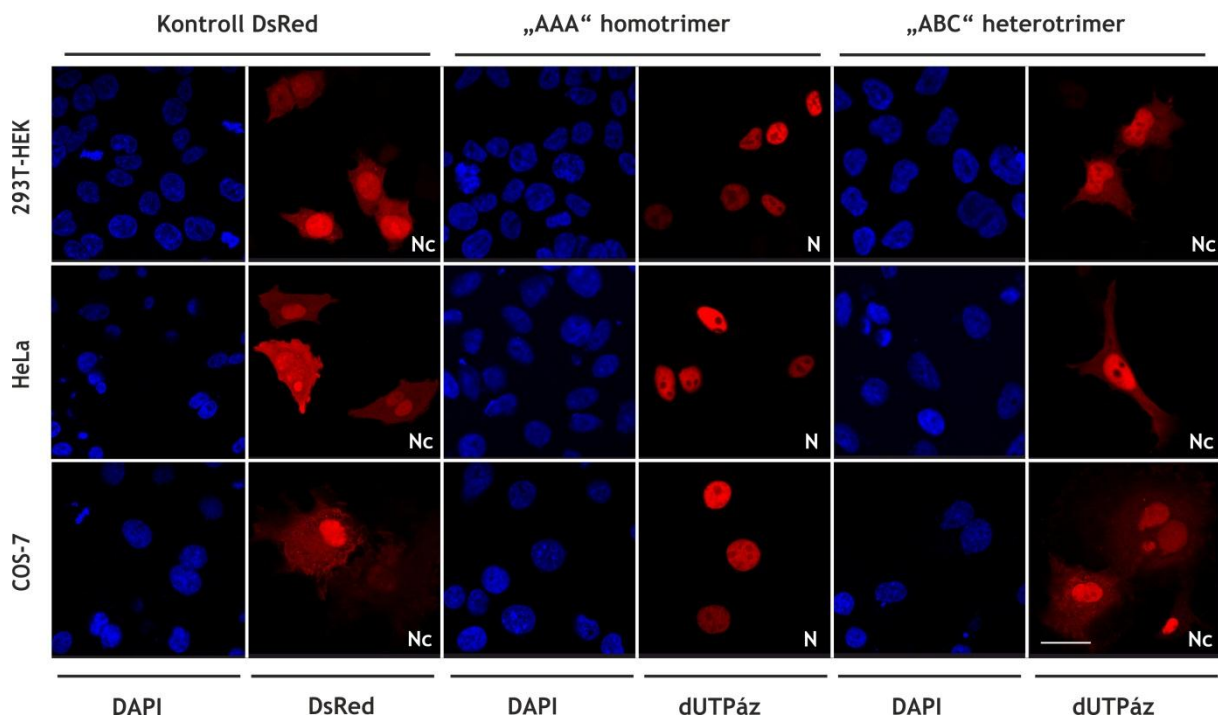
10. ábra

EGFP-vel jelölt „A” és „ABC” fehérjék lokalizációja 293T-HEK, HeLa és COS-7 emlős sejtekben.

Látható, hogy a csak EGFP-vel transzfektált sejtekben (kontroll) az EGFP közel diffúzan oszlik el. A három NLS-el rendelkező „AAA” homotrimer szigorúan sejtmagban, míg az egy NLS-t viselő „ABC” pszeudo-heterotrimer a mag mellett, a citoplazmában is megtalálható. A mérce 20 μ m.

A klónozással létrehozott, EGFP-vel vagy DsRed-del jelölt *D. virilis* dUTPáz „A” és „ABC” fehérjéket kódoló emlős expressziós plazmidokat háromféle emlős sejttypusba (293T-HEK, HeLa, COS-7) transzfektáltuk. Elsőnek azért emlős sejteken végeztük el a kísérleteket, mert ezek jóval nagyobb mértékben képesek az aljzathoz kitapadni, így morfológiájukból adódóan könnyebben használhatóak lokalizációs vizsgálatokra. Mindhárom sejttypusban és

mindkét fajta fluoreszcens jelzéssel azonos eredményt kaptunk, ami bizonyította, hogy sem a használt fluorofórok közötti különbség, sem a sejtvonalak eltérő genotípusos háttere nem befolyásolta a kísérletek kimenetelét, tehát egy általános mechanizmust figyelhetünk meg (10. és 11. ábra). Míg az „AAA” homotrimer a kizárólagosan a magba lokalizált, az „ABC” heterotrimer a citoplazmában is megjelent. A kontrollként alkalmazott üres pEGFP illetve üres pDsRed plazmidok termékei mindegyik sejttypusban diffúzan, a citoplazmában és a magban is detektálhatóak voltak, illetve néhol a sejtmagban volt megfigyelhető enyhe dúsulásuk.



11. ábra

DsRed-del jelölt „A” és „ABC” fehérjék lokalizációja 293T-HEK, HeLa és COS-7 emlős sejtekben.

EGFP-től eltérő fluorofór (DsRed) használata nem befolyásolta a fehérjék lokalizációját. Ebben az esetben is a több NLS-t hordozó „AAA” forma transzportálódott nagyobb mértékben a sejtmagba, mint az „ABC” pszeudoheterotrimer, ami a citoplazmában is megtalálható volt. A mérce 20 μ m.

A fluoreszcens konstrukciók lokalizációját rovar expressziós plazmidokba átklónozva Schneider S2 (*Drosophila*) és Sf9 (*Spodoptera*) sejtekben is megvizsgáltuk. Mivel a rovar sejtek kevésbé képesek letapadni az aljzathoz, ezáltal jóval gömbölyűbb a morfológiájuk, emiatt a sejtmag citoplazmától való elkülönítése igen nehézkes. Ennek kiküszöbölésére

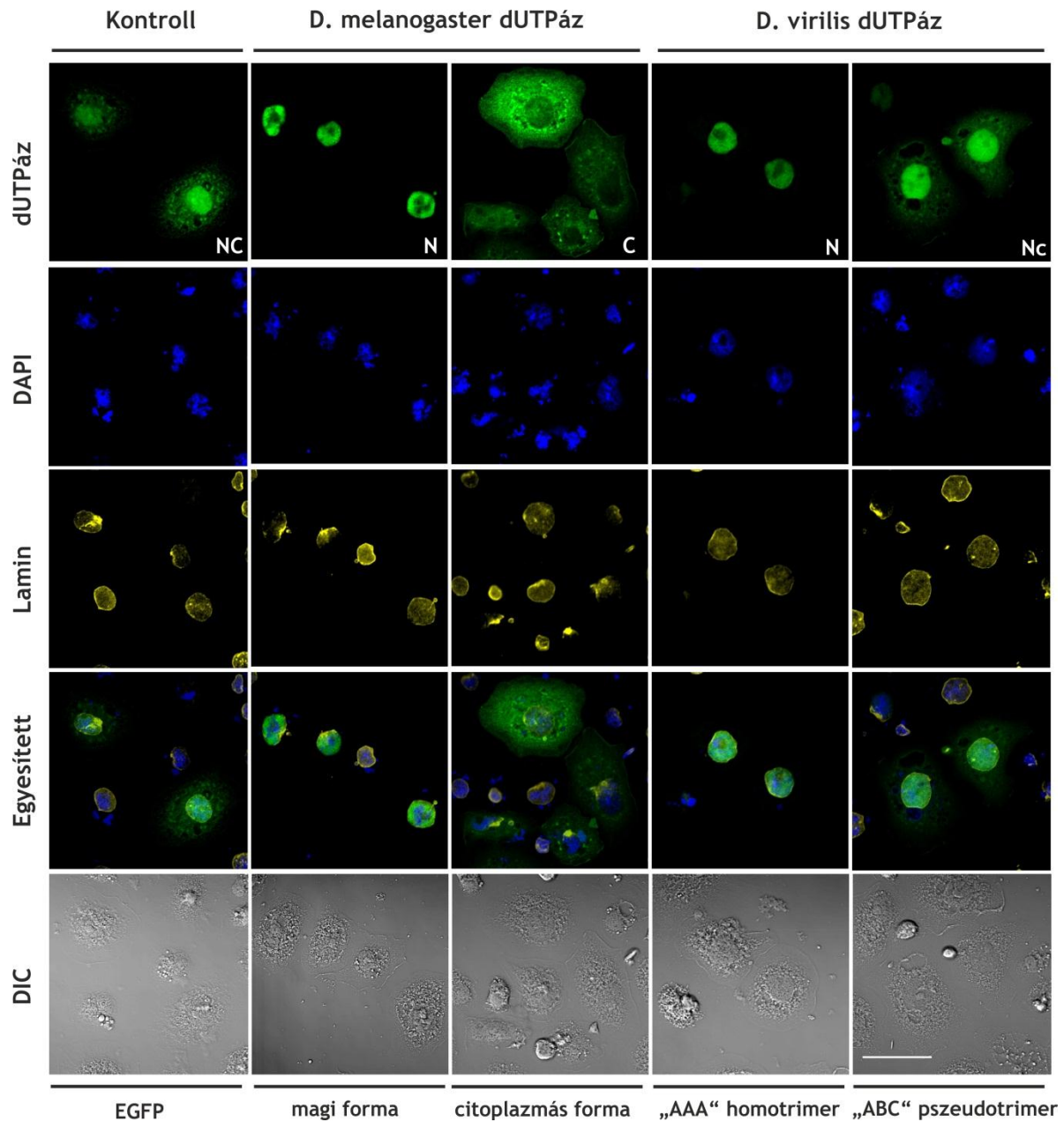
előzetesen concanavalin-A-val kezeltük az aljzatot. A concanavalin-A-ról azonban leírt, hogy a sejtfelszíni receptorokon keresztül beleszól az aktin hálózat szerveződésébe; az aktinról pedig az ismert, hogy egyes esetekben a sejtmagi transzport befolyásolója lehet [49]. Ezért egy másik sejtadhéziót serkentő anyaggal, poli-L-lizinnel kezelt óraüvegeken is elvégeztük a kísérleteket. Kontrollként a *D. melanogaster* dUTPáz ismert két izoformáját használtuk, amelyekről már leírták az egyértelmű magi (NLS-el bíró forma), illetve citoplazmás lokalizációt (NLS-el nem rendelkező izoforma) [50, 51]. Ezen fluoreszcens jelölt konstruktok Merényi Gábortól származnak.

A különböző rovar sejtvonalak és sejtadhéziót segítő anyagok esetében is mindvégig azonos eredményeket kaptunk. Az „AAA” homotrimer határozott magi lokalizációjával szemben az „ABC” pszeudo-heterotrimer a citoplazmában is megjelent, tehát a három NLS-el bíró forma nagyobb mértékben volt képes a sejtmagba transzportálódni, mint az egyetlen NLS-t hordozó konstrukció (12-13-14. ábrák). Ezek az eredmények hasonlóak az emlős sejtekben tapasztaltakkal (10-11. ábrák), amiből azt feltételezzük, hogy az oligomerizációval szerzett nagyobb NLS szám egy elterjedt import szabályozó mechanizmus lehet.

A sejtvonalakon tapasztalt eredmények után kíváncsiak voltunk, hogy vajon a dUTPáz expresszálo szövetekben az endogén fehérje készlet hova lokalizál a *Drosophila virilis*-ben. A dUTPáz-t, *Drosophila*-ban csak olyan lárvális szövetek expresszálják amelyek az egyedfejlődés során fennmaradnak, illetve a későbbi szervtelepek prekursorait képezik. Ezek közül többön (szárny imaginális korongon, lárvális herén, nyálmirigy imaginális korongon, központi idegrendszeren) is végeztünk immunhisztokémiai festést, ahol mindegyik szövettípusnál hasonló mintázatot tapasztaltuk, ezért csak a szárny imaginális korongon (diszkusz) végzett festést mutatom be részleteiben (14. ábra).

Láthatjuk, hogy az endogén *D. virilis* dUTPáz (azonos az egy NLS-t viselő „ABC” konstrukttal) főképp a magba lokalizál, hasonlóan a *D. melanogaster*-ben található ortológijához. A dUTPázról feltételezhető, hogy a nukleotid készlet pontos beállítását főként a sejtmagból végzi el, ezért funkcionális szempontból a *D. virilis* endogén („ABC” forma) fehérje sejtmagi lokalizációja értelmezhető. Ezek szerint a *D. virilis* dUTPáza egy NLS használatával is képes kellő mértékben a magba transzportálódni, így ellátva az egyedfejlődés során betöltendő feladatait. Ennek a transzport mechanizmusnak a részletei azonban egyelőre még ismeretlenek. Lehetséges, hogy az importin- α -án kívül más kölcsönható partnerek segítik az „ABC” forma sejtmagba jutását. Ilyenek lehetnek például más nukleáris transzport receptorok, vagy esetleg a sejtvázas mikrotubulus hálózata, melyről újabban leírt, hogy több

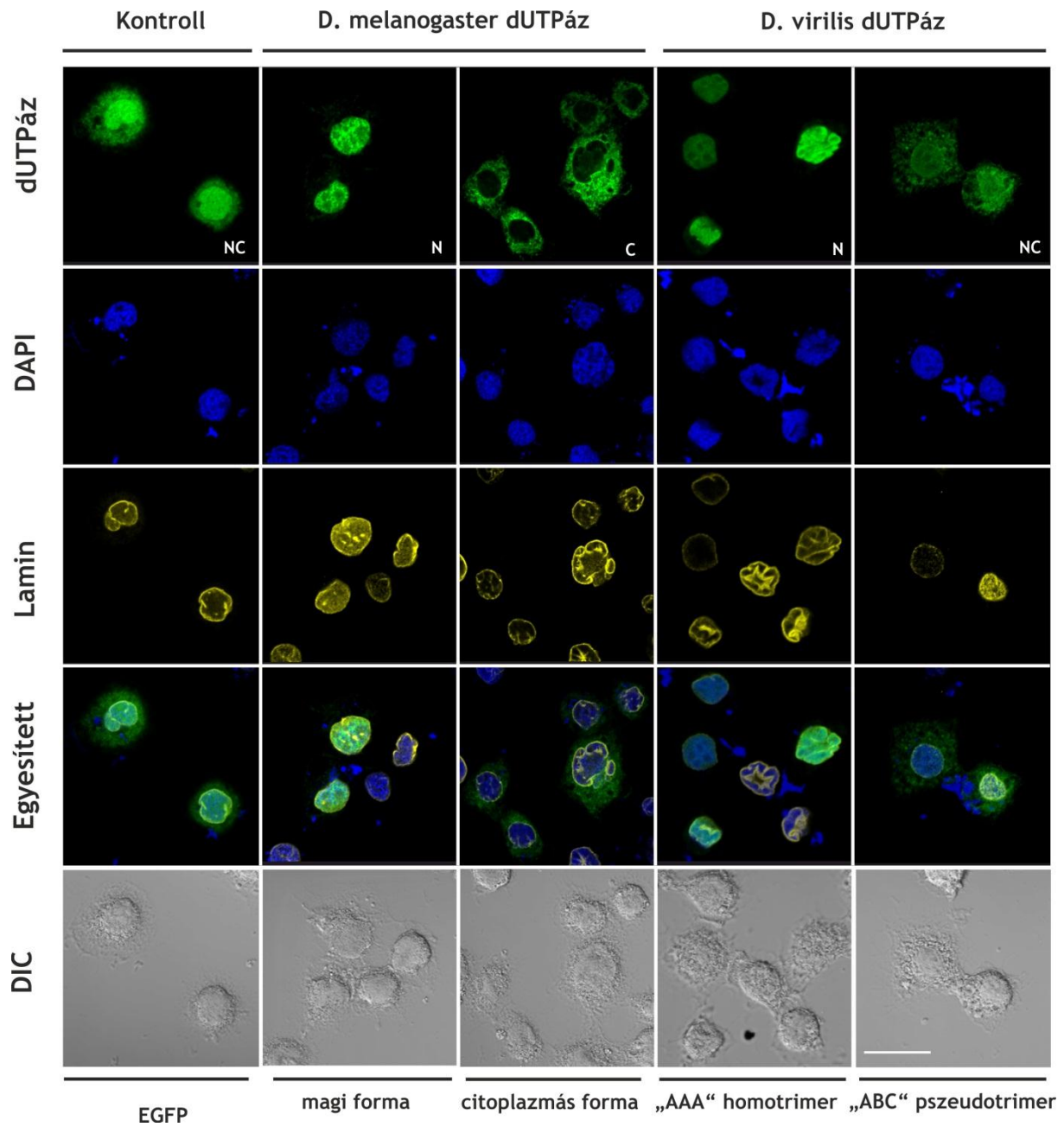
fehérje intracelluláris lokalizációjára is hatással lehet [52].



12. ábra

„A” és „ABC” fehérjék lokalizációja Schneider S2 rovar sejtekben, concanavalin-A-val kezelt óráüvegen.

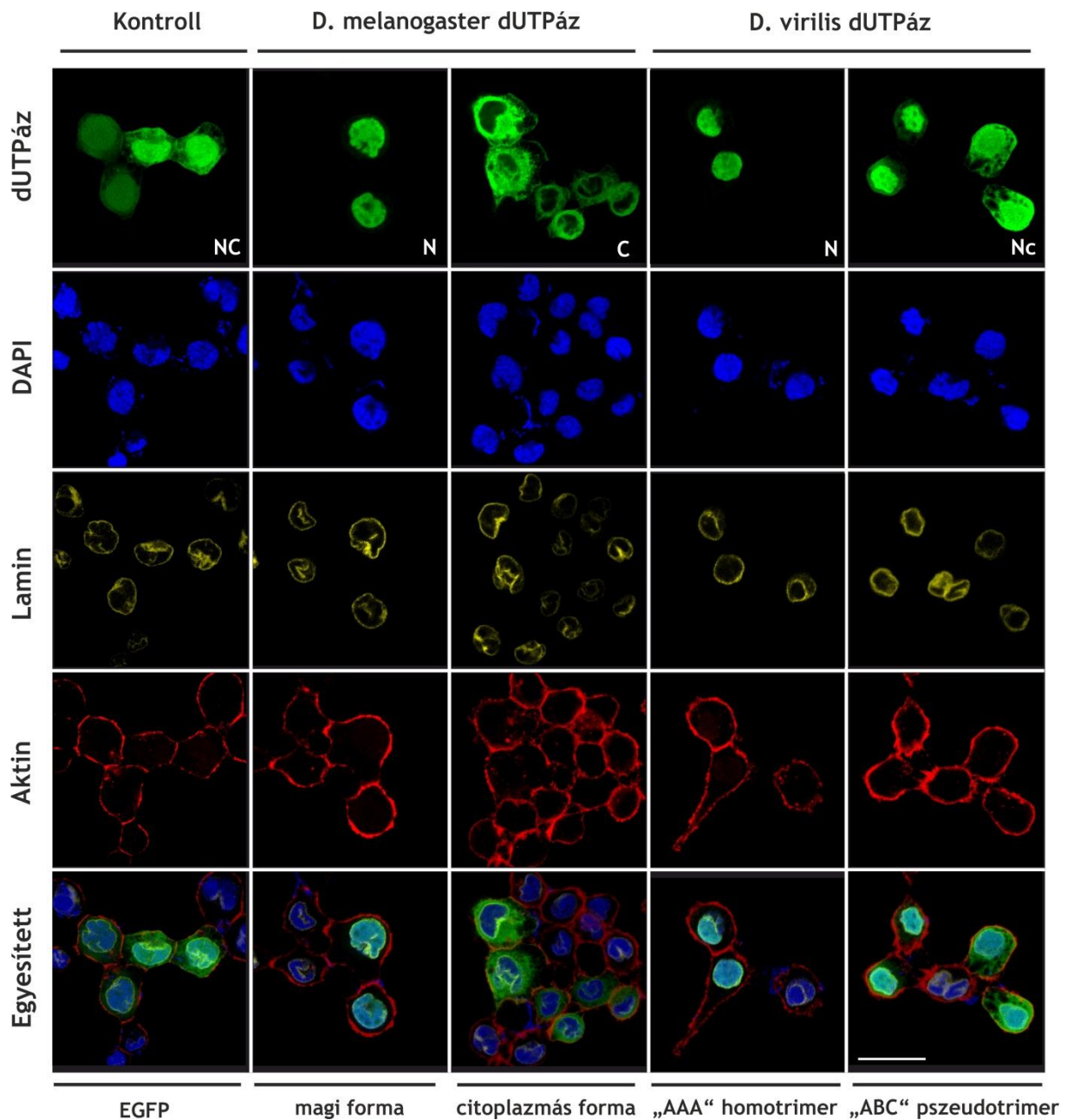
Az EGFP kontroll közel diffúz eloszlást mutat; sejtmagi és citoplazmatikus kontrollként a *D. melanogaster* hosszú illetve rövid dUTPáz izoformáit használtuk, melyekről már korábban bizonyított a kizárólagos sejtmagi illetve citoplazmás elhelyezkedés. A vizsgált fehérjék közül az „AAA” homotrimer teljesen magi, az „ABC” pszeudo-heterotrimer viszont a mag mellett, a citoplazmában is megtalálható. A mérce 25 μm .



13. ábra

„A” és „ABC” fehérjék lokalizációja Sf9 rovar sejtekben, concanavalin-A-val kezelt óraüvegen.

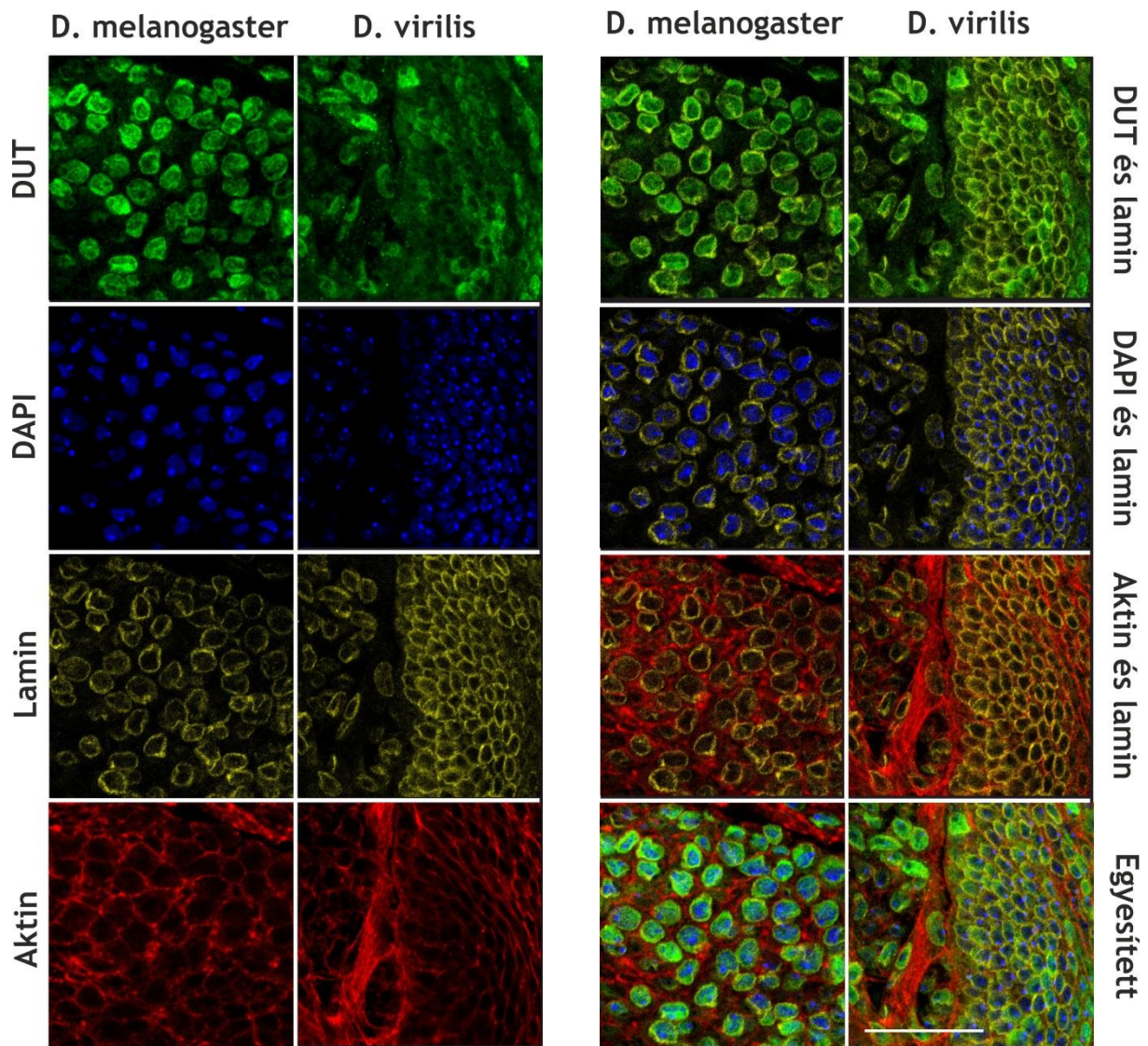
Az „AAA” homotrimer teljesen magi, az „ABC” pszeudo-heterotrimer viszont a mag mellett, a citoplazmában is megtalálható. Az EGFP kontroll közel diffúzan, a *D. melanogaster* hosszú dUTPáz izoformája a sejtmagban, míg rövid izoformája a citoplazmában helyezkedik el. A mérce 25 µm.



14. ábra

„A” és „ABC” fehérjék lokalizációja Sf9 rovar sejtekben, poli-L-lizinnel kezelt óraüvegen.

Az „AAA” homotrimer poli-L-lizin mellett is teljesen magi, az „ABC” pszeudo-heterotrimer pedig szintúgy a mag mellett, a citoplazmában is megtalálható. Az EGFP kontroll közel diffúzan, a *D. melanogaster* hosszú dUTPáz izoformája a sejtmagban, míg rövid izoformája a citoplazmában helyezkedik el. A mérce 25 μm .



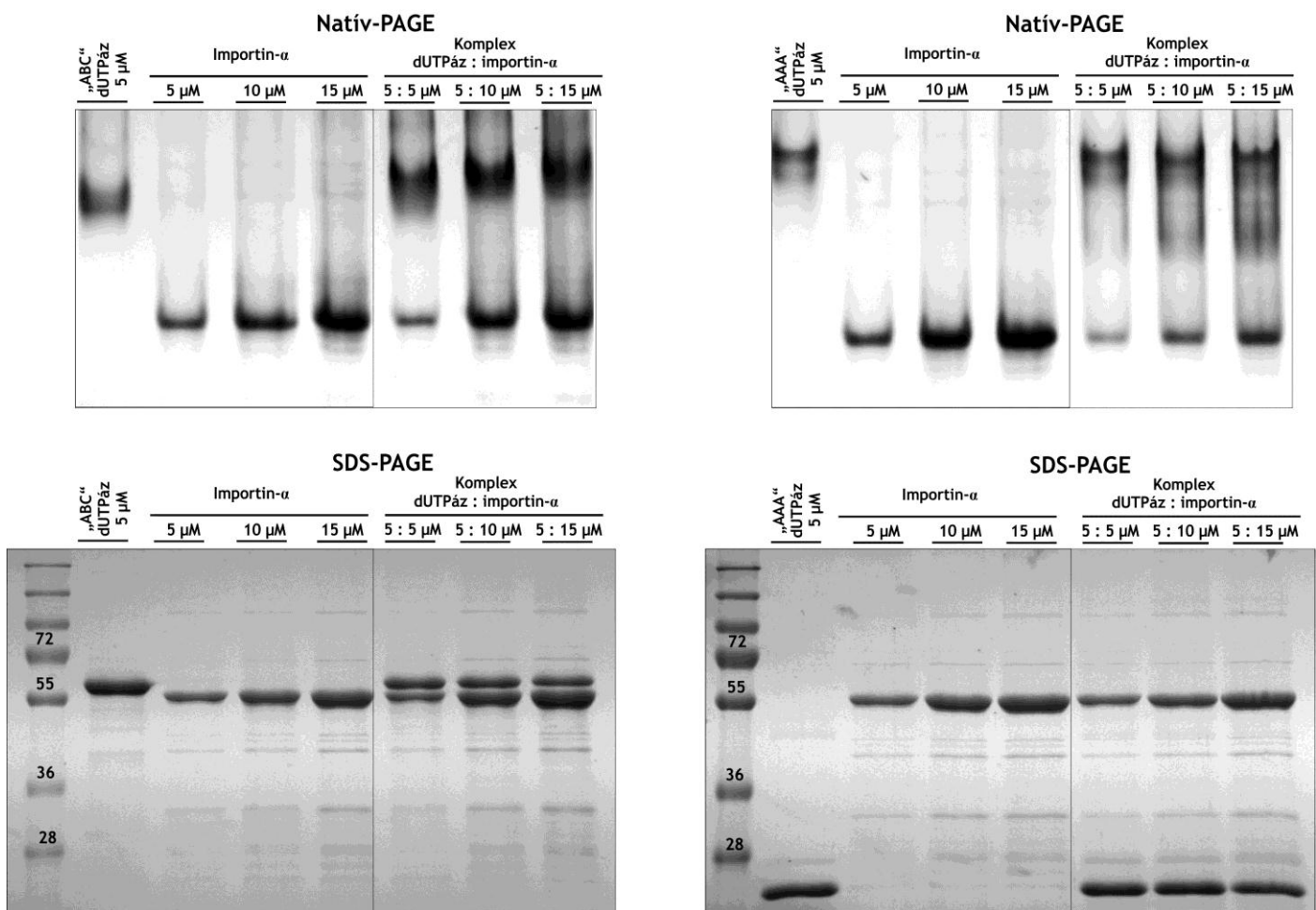
15. ábra

***Drosophila virilis* endogén dUTPázának lokalizációja lárvális szárnydiszkuszban.**

A különböző markerek (**lamin festés**=a sejtmaghártyát jelöli ki, **aktin festés**=a sejthatárokat jelöli ki, **DAPI festés**=a sejtmag DNS állományát jelöli ki) együttes használata bizonyítja, hogy az endogén *D. virilis* **dUTPáz** (1 NLS-ű „ABC” formának felel meg) is elsősorban a magba lokalizál. A *D. melanogaster* diszkusz endogén **dUTPáz**a is főleg a sejtmagban található. A mérce 20 μm .

Az importin- α dUTPáz komplex biofizikai jellemzése

A sejteken és a szöveteken megfigyeltek után szeretnénk volna *in vitro* is részletesebben karakterizálni a különböző *D. virilis* dUTPáz formák és az importin- α kölcsönhatását. A lehetséges komplexek létrejöttét először natív gélelektroforézissel vizsgáltuk. Mind natív-, mind SDS gélelektroforézisre is vittünk fel önálló és komplexáltatott fehérje mintákat (16. ábra). A natív-PAGE nem denaturáló körülményei mellett az „AAA” nem kovalens homotrimer egyben képes maradni, azaz a három NLS egyetlen makromolekuláris komplex



16. ábra

Az importin- α és a különböző dUTPázok komplexálódásának kvalitatív vizsgálata.

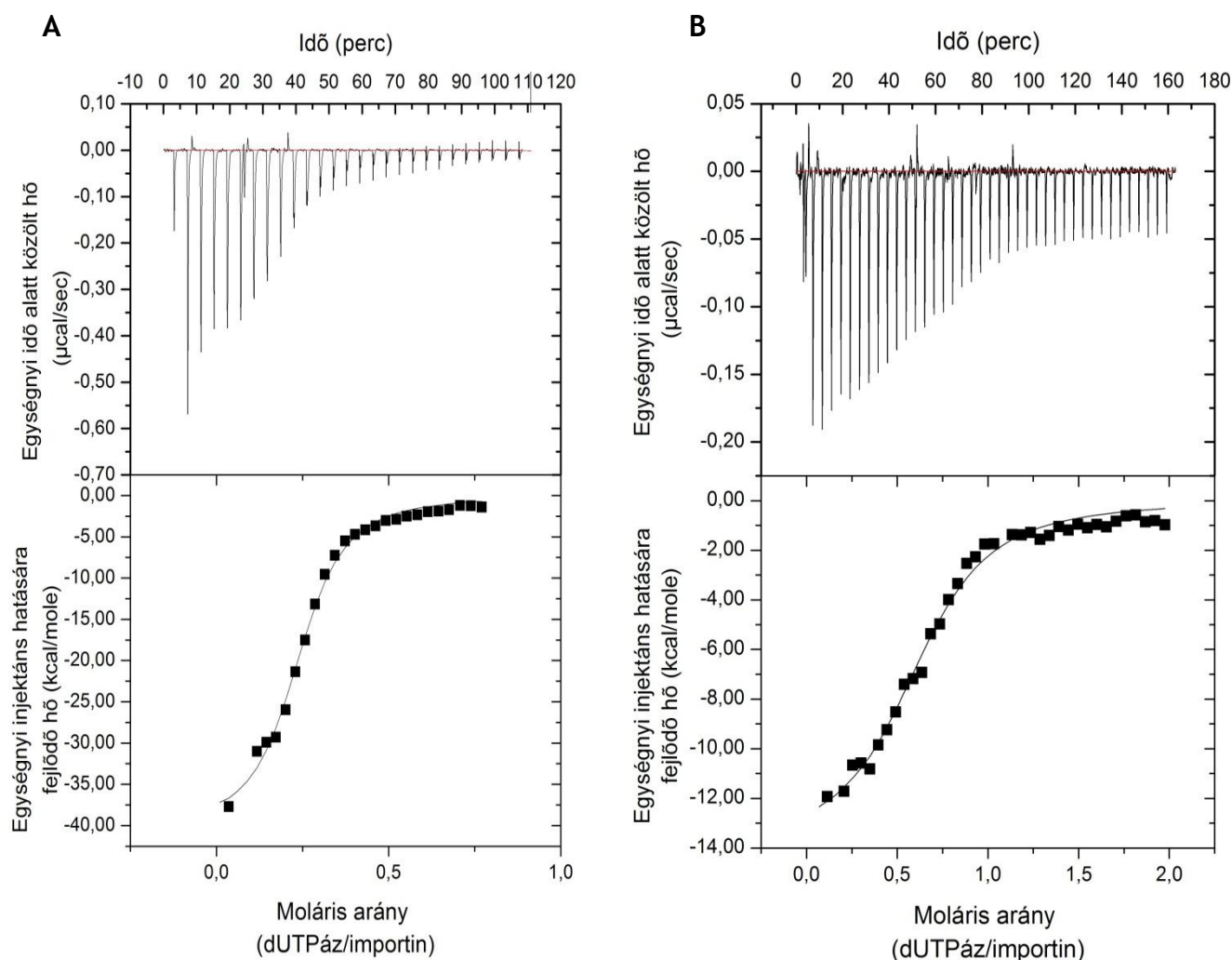
Az SDS PAGE denaturáló tulajdonságai miatt az „AAA” homotrimer alegységekre esik szét és a kovalensen kapcsolt „ABC” pszeudo-heterotrimernél (~58 kDa) jóval lentebb, ~21 kDa-nál jelenik meg. Natív gélen a fehérjekomplexek intakt formában maradnak, így az „AAA” homotrimer is egyben található. A szabad importin- α mennyiségéből látható, hogy az „AAA” dUTPáz nagyobb mértékben titrálja ki a szabad importint, mint az „ABC” konstrukt. Ennek a magasabb mértékű komplexálódásnak az oka, az „ABC” és „AAA” fehérjék közötti eltérő importin- α kötő affinitásban és/vagy sztöchiometriában kereshető.

(homotrimer) része. A natív-PAGE-en a dUTPáz/importin- α kapcsolatok sem bomlottak fel, jól kivehető hogy a dUTPáz-ok részben kititrálják az importin- α -t az annak megfelelő futási magasságából: a szabad importin mennyiség lecsökken, illetve látszik az importinnal való komplex képződés (sávképződés illetve erősödés). Azonos moláris koncentrációkban az „AAA” konstrukt szemmel láthatóan jobban kititrálta az importin- α -t, mint az „ABC” (szabad importin mennyiség és sávképződés). Ennek oka az eltérő affinitásban és/vagy sztöchiometriában kereshető.

A kérdés megválaszolására, a komplexálódás kvantitatív jellemzésére volt szükség, ennek során izotermális titrációs mikroklorimetriával (ITC) vizsgáltuk a kölcsönhatás minőségét (17. ábra). A műszer a komplexképződést kísérő hő változást méri a titrálás közben, amelyből többek között a disszociációs állandót (K_d) és a kötési sztöchiometriát (N) lehet megbecsülni. Mindkét esetben az importint titráltuk a dUTPáz-zal (lásd. Anyag és módszer). Az „A” és az „ABC” dUTPáz esetében is exoterm kötési reakciót mutatnak a mérési pontok (17. ábra/A&B). Mindkét konstrukt esetén a disszociációs állandó (K_d) nagyságrendileg azonos értéke mutatja (17. ábra/C), hogy a két különböző fehérje azonos affinitással kapcsolódik az importin- α -hoz, feltehetően az azonos NLS szignáljuk miatt. A natív gélen látott eltérésért tehát valószínűleg az eltérő sztöchiometria a felelős. Az N érték a titrált fehérjén (importin- α) lévő kötőhelyek számát mutatja meg. Amennyiben egy dUTPáz trimer három importin- α -t köt, akkor N-re a várt érték 0.3, ha egy dUTPáz trimerrel csak egy importin- α kapcsolódik, akkor a várt N érték 1. Az „AAA” homotrimernél a mért $N=0.245$ érték közelít a 0.3-hoz, az „ABC” pszeudo-heterotrimer $N=0.648$ értéke pedig az 1-hez (9. ábra/C).

A várt és a számított értékek közötti eltérés az ITC mérések általános érzékenységéből adódhat. Számos tényező okozhat mérésbeli devianciákat, például a fehérjeminták esetleges inhomogenitása esetén az egyes injektálásokkor nem azonos mennyiségű dUTPáz kerülhetett a rendszerbe, megváltoztatva ezzel a mérés kimenetelét. Továbbá a kezdeti állapothoz képest a kísérlet előrehaladásával (2-2.5 óra) a fehérjék egy részének feltekeredése is megváltozhatott, ami módosíthatott az NLS-ek fizikai elérhetőségén. Mindezek mellett az ITC mérésekhez nagyon tiszta fehérje preparátumokra és pontos koncentráció adatokra van szükség. Ezek elérésére az affinitás kromatográfiás fehérje tisztítást követően gélszűréssel is tisztítottuk a preparátumokat, így kinyerve a megfelelően feltekeredéssel bíró frakciót. A minták tisztaságát SDS-PAGE-en ellenőriztük, ami minden esetben 95% felettinek bizonyult. A preparátumok koncentrációját Bradford technikával, és fehérjék triptofánjait detektálva spektrofotometriás

mérésekkel kívántuk minél pontosabban meghatározni. Ezek a technikák mind jó közelítést adnak a minta valós koncentrációjára, azonban tökéletes pontosságúnak egyik sem tekinthető.



Importin- α titrálása különböző dUTPázokkal		
	"AAA"	"ABC"
Importin- α koncentráció (μM)	53.2	32
<i>D. virilis</i> dUTPáz trimer koncentráció (μM)	194.4	300
K_d (μM)	$1,1 \pm 0,123$	$2,35 \pm 0,292$
ΔH (cal/mol)	-40430 ± 1073	$-13950 \pm 460,7$
ΔS (cal/mol/K)	-111	-21.8
N	$0,245 \pm 0,00439$	$0,648 \pm 0,0146$

17. ábra

Az importin- α és a különböző dUTPázok komplexálódásának kvantitatív vizsgálata.

A/ Importin- α „AAA” dUTPázal titrálva ITC készülékben. Az első kép negatív csúcsai az egyedi injektálások során felszabaduló hőmennyiséget jelzik. A szoftver a piros vízszintes alapvonalról számítva integrálja a csúcsokat. Az így kapott adatokra illesztett görbe a második képen látható. **B/** Importin- α „ABC” dUTPázal titrálva ITC készülékben. **C/** ITC mérések eredményei. K_d , disszociációs állandó; ΔH , kötési entalpia; ΔS , kötési entrópia; N, a kötési sztöichiometriája. Amennyiben egy dUTPáz három importin köt, úgy a várt N érték 0.3; egy importin kötése esetén a várt N érték 1. A mért adatok az „AAA” homotrimer esetében három, az „ABC” pseudo-heterotrimer esetében egy importin- α kötődésére utalnak.

Diszkusszió: általános modell felállítása

Az NLS közeli foszforiláció transzport szabályozó szerepe korábban is ismert volt, de keveset tudunk annak pontos mechanizmusáról. Ennek mélyebb megértése központi jelentőségű, hiszen számos élettani folyamatot irányító fehérje szabályozódik ilyen módon (1. táblázat). A teljes fehérjét és önálló, intakt NLS szegmenst célzó vizsgálataink során több mutánsnál (UBA1 S4E & L6Δ, UNG S14E) is megfigyelhető, hogy a szignál közeli foszforiláció megváltoztatja a lokalizációt (7. és 9. ábra). Kísérletes eredményeink és az ismert importin- α /NLS kristályszerkezetek alapos értékelése után egy olyan táblázatba rendeztük a szignál szekvenciákat, ahol az importin- α kötőárába próbáltuk illeszteni őket (2. táblázat).

Hipotézisünk szerint a negatív töltéssel rendelkező foszfátcsoportnak az importin- α kötőárok P-1 pozíciójában (2. táblázat) kell lennie, ahhoz hogy megakadályozza a magi akkumulációt. Az elmélet további tesztelésére hoztuk létre az Swi6 A160ins és az UNG A16del mutánsokat. Az Swi6 A160ins esetében egy aminosav pozícióval kitöltük a foszfor szerint mimikáló glutaminsavat a P-1 pozícióból, és ezzel visszanyertük a magi lokalizációt (menekítés), sőt a vad típusnál is magibb lokalizációt tapasztaltunk. Ez az eredmény korellál az irodalommal, miszerint szintetikus, importin- α inhibitorok tervezésekor megfigyelték, hogy a P-2 pozícióban lévő negatív töltés növeli az importin- α -hoz kötődés mértékét [48]. Ezzel magyarázható, az UNG S14E mutánsnak a vad típusú NLS-nél magibb lokalizációja is (9. ábra). Az UNG S14E & A16del mutánsnál a negatív töltést a P-1 pozícióba helyeztük át, ami viszont már egyértelműen gyengítette az NLS-t (9. ábra). A fenti eredményeinkből látszik, hogy egyes magi fehérjék nukleuszba jutását gátolja a P-1 pozícióban elhelyezkedő negatív töltés, a magi transzport viszont erősödik, ha ugyanez a töltés P-2 pozícióban van. (A p53 fehérje bipartit NLS-sel rendelkezik, emiatt egy speciális eset, mivel többféle módon is beilleszkezhethet az importin- α kötőárába. Ezért a p53-ra vonatkozó eredményeket e tekintetben nem interpretáltuk.)

Az eredményeink egy általánosan elterjedt, foszforilációval szabályozott magi transzportrendszer meglétére utalnak, amelyben a negatív töltés pontos pozíciója szigorúan meghatározza a lokalizációt. A rendszer általános érvényességét az is alátámasztja, hogy számos sejtvonalban is azonos eredményeket kaptunk. Feltételezzük, hogy a mitózis befejeztével keletkező leánysejtek bizonyos fehérjékre nézve egy felfoszforilált anyai készletet örökölnék (1. ábra). Ennek sorsáról (pl. defoszforilálással visszajuttatják a magba, citoplazmában hagyják, vagy esetleg lebontják) saját maguk dönthetnek, ami széleskörű és

gyors válaszadási lehetőséget biztosít a sejteknek a különböző extra- vagy intracelluláris változásokra. Ennek a szabályozásnak a szerepe jól érzékeltethető olyan fehérjéken, amely alapvetően a sejtmagban funkcionálnak, ellenben fontos hogy a sejtciklus egy bizonyos szakaszában ne legyen ott jelen (1. táblázat). Jó példák erre a transzkripció faktorok, vagy a sejtosztódást vezénylő fehérjék (pl. CDC6) melyek esetén kiemelkedő fontosságú, hogy időben pontosan szabályozva jussanak a magba vagy záródjanak ki onnét [34].

Ezért további célunk *in silico* bioinformatikai módszerekkel prediktálni a humán proteom azon CDK1 szubsztrátjait, amelyeken a foszforilációs hely NLS közelébe esik, ezáltal hasonlóan viselkedhetnek (NLS predikció NucImport szoftverrel; CDK1 konszezus foszforilációs hely predikció Predikin szoftverrel). Találatainkat a már kidolgozott β -galaktozidázt tartalmazó riporter rendszerben szeretnénk tesztelni. Kérdéses, hogy az esetleges pozitív találatok között a sejtbeli funkciójukban található-e hasonlóság, azaz a feltételezett általános sejtciklus függő, foszforilációval szabályozott transzportmechanizmus kifejezetten adott típusú fehérjékre jellemző-e. Ezt Gene Ontology (GO) analízissel szeretnénk megvizsgálni.

Mivel több oligomerizációra képes magi fehérje transzportja is szabályozódhat foszforilációval, ilyenkor lehetségessé válhat, hogy az oligomer (NLS) foszforiláltságának mértéke tovább finomítsa a fehérje aktuális intracelluláris elhelyezkedését. A kérdés körüljárásához használt egy, és három szignállal rendelkező *D. virilis* oligomer fehérjék magi transzportfolyamatainak vizsgálata során kapott eredményeink azt mutatják, hogy az elérhető NLS szám jelentősen befolyásolja egy oligomer magba vándorlásának mértékét. Ha a komplex NLS-einek csak egy hányada foszforilált, úgy a foszforiláció hatása kevésbé tud érvényesülni, mint az összes NLS-én módosított komplex esetében. Ezáltal a foszforilációs és defoszforilációs eseményekkel dinamikusan változtathatóvá válik az oligomerek aktív NLS-einek elérhetősége, így a magba irányuló transzport folyamatok rendkívül finoman és gyorsan hangolhatóvá válnak.

Irodalom

1. Cook, A., et al., *Structural biology of nucleocytoplasmic transport*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 647-71.
2. Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M.P. Rout, *The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(7): p. 490-501.
3. Christophe, D., C. Christophe-Hobertus, and B. Pichon, *Nuclear targeting of proteins: how many different signals?* Cell Signal, 2000. **12**(5): p. 337-41.
4. Hodel, M.R., A.H. Corbett, and A.E. Hodel, *Dissection of a nuclear localization signal*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1317-25.
5. Conti, E., et al., *Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha*. Cell, 1998. **94**(2): p. 193-204.
6. Lange, A., et al., *Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5101-5.
7. Makkerh, J.P., C. Dingwall, and R.A. Laskey, *Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids*. Curr Biol, 1996. **6**(8): p. 1025-7.
8. Robbins, J., et al., *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence*. Cell, 1991. **64**(3): p. 615-23.
9. Sorokin, A.V., E.R. Kim, and L.P. Ovchinnikov, *Nucleocytoplasmic transport of proteins*. Biochemistry (Mosc), 2007. **72**(13): p. 1439-57.
10. Kosugi, S., et al., *Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 478-85.
11. Fontes, M.R., T. Teh, and B. Kobe, *Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha*. J Mol Biol, 2000. **297**(5): p. 1183-94.
12. Marfori, M., et al., *Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(9): p. 1562-77.
13. Kalderon, D. and A.E. Smith, *In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T*. Virology, 1984. **139**(1): p. 109-37.
14. Leung, S.W., et al., *Dissection of the karyopherin alpha nuclear localization signal (NLS)-binding groove: functional requirements for NLS binding*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41947-53.
15. Riddick, G. and I.G. Macara, *A systems analysis of importin-{alpha}-{beta} mediated nuclear protein import*. J Cell Biol, 2005. **168**(7): p. 1027-38.
16. Gorlich, D., et al., *A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus*. EMBO J, 1996. **15**(8): p. 1810-7.
17. Kobe, B., *Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(4): p. 388-97.
18. Harreman, M.T., et al., *The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5854-63.
19. Jans, D.A., et al., *p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins*. J Cell Biol, 1991. **115**(5): p. 1203-12.
20. Nardoizzi, J.D., K. Lott, and G. Cingolani, *Phosphorylation meets nuclear import: a review*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 32.
21. Jans, D.A., *The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation*. Biochem J, 1995. **311** (Pt 3): p. 705-16.

22. Stommel, J.M., et al., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1660-72.
23. Kitamura, R., et al., *Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential*. J Virol, 2006. **80**(4): p. 1979-91.
24. Suo, Y. and J.A. Miernyk, *Regulation of nucleocytoplasmic localization of the atDjC6 chaperone protein*. Protoplasma, 2004. **224**(1-2): p. 79-89.
25. Tagawa, T., et al., *The cell cycle-dependent nuclear import of v-Jun is regulated by phosphorylation of a serine adjacent to the nuclear localization signal*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 255-63.
26. Zhang, F., R.L. White, and K.L. Neufeld, *Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12577-82.
27. Hennekes, H., et al., *Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2*. J Cell Biol, 1993. **120**(6): p. 1293-304.
28. Jans, D.A., et al., *Cyclin-dependent kinase site-regulated signal-dependent nuclear localization of the SW15 yeast transcription factor in mammalian cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17064-7.
29. Kaffman, A., N.M. Rank, and E.K. O'Shea, *Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121*. Genes Dev, 1998. **12**(17): p. 2673-83.
30. Sidorova, J.M., G.E. Mikesell, and L.L. Breeden, *Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(12): p. 1641-58.
31. Liku, M.E., et al., *CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 5026-39.
32. Enquist-Newman, M., M. Sullivan, and D.O. Morgan, *Modulation of the mitotic regulatory network by APC-dependent destruction of the Cdh1 inhibitor Acm1*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 437-46.
33. Zhou, Y., et al., *Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12530-6.
34. Takei, Y., K. Yamamoto, and G. Tsujimoto, *Identification of the sequence responsible for the nuclear localization of human Cdc6*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 292-6.
35. Holaska, J.M., K.L. Wilson, and M. Mansharamani, *The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 357-64.
36. Kutay, U. and M.W. Hetzer, *Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(6): p. 669-77.
37. Hernandez-Verdun, D., *Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle*. Nucleus, 2011. **2**(3): p. 189-94.
38. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. **42**(1): p. 97-106.
39. Handley-Gearhart, P.M., et al., *Human ubiquitin-activating enzyme, E1. Indication of potential nuclear and cytoplasmic subpopulations using epitope-tagged cDNA constructs*. J Biol Chem, 1994. **269**(52): p. 33171-8.
40. Nagai, Y., et al., *Ubiquitin-activating enzyme, E1, is phosphorylated in mammalian cells by the protein kinase Cdc2*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 6): p. 2145-52.

41. Bischoff, J.R., et al., *Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4766-70.
42. Liang, S.H. and M.F. Clarke, *A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32699-703.
43. Dephoure, N., et al., *A quantitative atlas of mitotic phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10762-7.
44. Takacs, E., V.K. Grolmusz, and B.G. Vertessy, *A tradeoff between protein stability and conformational mobility in homotrimeric dUTPases*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 48-54.
45. Schickedanz, J., K.H. Scheidtmann, and G. Walter, *Kinetics of nuclear transport and oligomerization of simian virus 40 large T antigen*. Virology, 1986. **148**(1): p. 47-57.
46. Falces, J., et al., *Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin alpha/beta: insights into a complete import complex*. Biochemistry, 2010. **49**(45): p. 9756-69.
47. Otterlei, M., et al., *Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(20): p. 4611-7.
48. Kosugi, S., et al., *Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling*. Chem Biol, 2008. **15**(9): p. 940-9.
49. Toh, B.H. and C.C. Hard, *Actin co-caps with concanavalin A receptors*. Nature, 1977. **269**(5630): p. 695-7.
50. Muha, V., et al., *Nuclear localization signal-dependent and -independent movements of Drosophila melanogaster dUTPase isoforms during nuclear cleavage*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(2): p. 271-5.
51. Merenyi, G., E. Konya, and B.G. Vertessy, *Drosophila proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals*. FEBS J, 2010. **277**(9): p. 2142-56.
52. Campbell, E.M. and T.J. Hope, *Role of the cytoskeleton in nuclear import*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(6): p. 761-71.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Borsos Máté

- szubklónozáshoz inszerteket PCR-eztem
- a plazmidokon és inszerteken restrikciós DNS emésztést végeztem
- a DNS fragmenteket gélből izoláltam, DNS-t ligáltam és *E. coli* transzformálást végeztem
- mutagenézis PCR-t végeztem
- NLS oligokat anellátattam
- a mintákat szekvenálásra küldtem
- a sejt kultúrákon DNS transzfekciót végeztem
- az óráüvegeket poli-L-lizinnel és ConcanavalinA-val kezeltem
- a sejteken és szöveteken immunfestést végeztem
- a mintákat konfokális és epifluoreszcens mikroszkóppal fényképeztem

A következő lépéseket Pálincás Hajnalka MSc-s diákkal közösen végeztem:

- *Drosophila* dUTPázokat és importint expresszáltattunk *E. coli*-ban
- a fehérjéket affinitás oszlopon (Ni-NTA) pucoltuk
- a mintákat tovább tisztítottuk gél szűrővel
- a fehérjéket SDS és Natív PAGE-n futtattuk
- ITC méréseket végeztünk

.....
aláírás

Budapest, 2013 január 09.