

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A KALCINEURIN SZEREPE A MIOZIN FOSZFATÁZ ÉS AZ
ENDOTÉL BARRIER FUNKCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Kolozsvári Bernadett

Témavezető: Dr. Bakó Éva



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

A kalcineurin szerepe a miozin foszfatáz és az endotél barrier funkció szabályozásában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kolozsvári Bernadett okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Bakó Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D
Dr. Szatmári István, Ph.D

A doktori szigorlat időpontja: 2012. november 13.

Az értekezés bírálói:

Dr. Cervenák László, Ph.D
Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, Ph.D

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Cervenák László, Ph.D
Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, Ph.D
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D
Dr. Szatmári István, Ph.D

Az értekezés védésének időpontja: 2012. november 13. 13:00
I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

BEVEZETÉS

Az endotél barrier funkció jelentősége

A vaszkuláris endotéliumban az endotél sejtek (EC) konfluens monolayert alkotnak az erek belső falán, ezáltal számos élettani folyamatban fontos szabályozó szerepet töltenek be. Feladatuk, hogy megőrizték az érfal szelektív barrier funkcióját, a keringő vér és a környező szövetek között, ugyanakkor tegyék lehetővé bizonyos molekulák transzportját. Fiziológiai stimulusokra és/vagy gyulladásos folyamatokban az endotél monolayer integritása megváltozhat, amely a sejtek közötti rések kialakulásához, ezzel a barrier funkció sérüléséhez és megnövekedett vaszkuláris permeabilitáshoz vezethet. EC-ben trombin kezelés hatására növekszik az aktin polimerizációja és a kortikális aktin filamentumokban csökkenés, míg a stressz-kábelek mennyiségében egyidejű növekedés figyelhető meg, mellyel párhuzamosan kontrakció történik.

A citoskeletális valamint az intracelluláris sejtkapcsoló struktúrák fehérjéinek, fiziológiai funkciót szerin/treonin/tirozin (Ser/Thr/Tyr) oldalláncuk foszforilációja ill. defoszforilációja is módosíthatja. Ez a foszforilációs szabályozás átalakító enzimeire, a protein kinázok és foszfatázok szerepére hívja fel a figyelmet az EC citoskeleton szerkezetének és a sejt-sejt kapcsolatok szabályozásának feltárásában.

Számos tanulmány igazolta, hogy a nem-izom miozin-II 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációs szintje a barrier funkció egyik fontos tényezője. Kimutatták például, hogy gyulladáskeltő effektorok (trombin, hisztamin) hatására a MLC20 foszforilációs szintje gyorsan emelkedik és ezzel párhuzamosan az EC permeabilitása növekedik. A MLC20 foszforilációját katalizáló enzimek közül a Ca^{2+} -kalmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)-függő MLC kináz (MLCK) endotél specifikus formájának szerepe elsődleges jelentőségű, amelynek működési feltétele az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megfelelő szintű növekedésével kialakuló $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplex kötődése az enzimhez. Az MLC20 defoszforilációját a miozin foszfatáz (MP) enzim katalizálja, amelynek aktivitása sokoldalúan szabályozható, a regulátor alegység foszforilációjával és különböző inhibitor fehérjékkel.

A PP2B (kalcineurin/CN) egy $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -függő Ser/Thr specifikus foszfatáz. Szerepét az EC barrier funkciójának a szabályozásában már számos korábbi megfigyelés igazolta. Kimutatták, hogy a CN specifikus gátlása ciklosporin A (CsA)-val vagy FK506-al csökkenti a trombin kezelés következtében foszforilálódott citoskeletális fehérjék defoszforilációját, valamint a barrier funkció sérülés utáni regenerációját is. Nem volt ismert azonban, hogy

vajon a CN közvetlenül részt vesz-e a MP aktivitásának szabályozásában EC-ben. Munkánk egyik fő célkitűzése e kérdés tanulmányozása volt.

Miozin foszfatáz szerkezete, funkciója és szabályozása

A MP holoenzim heterotrimer fehérjekomplex, amely 38 kDa protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegységből (PP1c δ), 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1) és egy 20 kDa (M20) fehérjéből áll. A MP holoenzimben a MYPT1 alegység szabályozza a PP1c szubsztrát-specifitását és aktivitását is. A MYPT1 foszforilációja a Thr696 és Thr853 oldalláncokon gátolja a PP1c aktivitást. A MYPT1 ezen kívül fehérje-fehérje kölcsönhatási platformként is szolgál, N- és/vagy C-terminális régióihoz a MP szubsztrátjai ill. szabályozó fehérjéi is kapcsolódhatnak. A PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régióinak van alapvető szerepe, amelyek közül elsődleges fontosságú a ³⁵KVKF³⁸ kötőmotívum. A foszforilált miozinnal és MLC20-al való kölcsönhatásban az N-terminális, ankirinszerű ismétlődések játszanak szerepet.

Endotéliumban és simaizomban a MP szabályozása hasonló. A RhoA/ROK (Rho-kináz) jelátviteli útvonal aktiválásával a ROK a Thr696 és Thr853 oldalláncokon foszforilálja MYPT1-et és ezzel a MP foszfatáz aktivitásának gátlását okozza. Másrészt a MYPT1 foszforilációja az enzim aktiválását is eredményezheti. Ciklikus nukleotid-függő kinázok (pl. a protein kináz A (PKA) vagy a protein kináz G (PKG)) a MYPT1 Ser695 oldallancát foszforilálják. Ez nincs közvetlen hatással az enzim aktivitására, de megakadályozza a MYPT1 Thr696 oldallancának ROK által történő foszforilációját, kivédve így a MP gátlását. Ciklin-függő kináz(ok) a MYPT1 középső régióját foszforilálják, ezzel a miozin iránti affinitás növekedik, a foszfatáz aktiválódik.

Kevés ismeretünk van azonban a foszforilált MYPT1 defoszforilációjára vonatkozóan, különösen EC-ben. A PP2A és a CN defoszforilálja a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} oldallancait *in vitro*. A PP2A gátlása foszfatáz gátló toxinokkal (okadánsav (OA) vagy kalikulin-A (CLA)) növeli a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} szintjét HepG2 és THP-1 sejtekben, ami a PP2A *in vivo* szerepére utal a MYPT1 defoszforilációjában. A CN szerepét a MYPT1 defoszforilációjában *in vivo* azonban eddig nem bizonyították.

A CN szerkezete és szabályozása

A CN egy katalitikus domént tartalmazó 58-61 kDa molekulatömegű A alegységből (CNA) és 16-19 kDa molekulatömegű Ca²⁺-kötő regulátor B alegységből (CNB) áll. Ez a heterodimer az aktív centrumban Fe²⁺-Zn²⁺ ionokat tartalmaz és Ca²⁺/CaM kötődését

követően mutat foszfatáz aktivitást. Az emlős CNA alegységének három izoformája (α , β és γ) ismert, amelyek alternatív hasítás („splicing”) termékei.

A CN aktivitását elsősorban az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozza. Nyugvó sejtekben, alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett a CaM nem kötődik a CN-hoz és az enzim inaktív formában van jelen. Amikor a sejtet az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedését kiváltó inger éri a Ca^{2+} a CaM-hoz kapcsolódva konformáció változást idéz elő, ami lehetővé teszi a Ca^{2+} /CaM komplex CNA-hoz való kötődését és a foszfatáz aktivitás növekedését. A CN aktivitását az aktív helyen található fémionok (Fe^{2+} , Zn^{2+}) redox állapota, valamint az enzim foszforilációja is szabályozza. A Ca^{2+} /CaM-függő protein kináz II (CaMK-II) autofoszforilált formája képes a CNA alegységet foszforilálni és ezáltal gátolni a Ca^{2+} /CaM kötődését, ami a foszfatáz aktivitás csökkenését eredményezi. A CN specifikus inhibitorai, a CsA vagy az FK506, a ciklofilin A-val (CypA) vagy az FK506-kötő fehérjével (FKBP12) kapcsolódva (komplexet alkotva) fejtik ki CN gátló hatásukat.

CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy a kalcineurinnak (CN) fontos szerepe van a marha és humán tüdő artéria EC citoszkeleton szerkezetének és a barrier funkciójának szabályozásában is. Bizonyították, hogy a CN katalitikus alegység (CNA) mindhárom izoformája ($\text{CNA}\alpha$, $\text{CNA}\beta$ és $\text{CNA}\gamma$) közel azonos mennyiségben expresszálódik humán EC-ben, amelyek aktivitása trombin kezelés hatására fokozódik. Mindezek ellenére a CN vaszkuláris endotél sejtekben betöltött pontos funkciója és annak molekuláris háttere nem minden részletében tisztázott.

Endotél modell rendszerben, az MLC20 foszforiláció ill. az aktin polimerizáció szabályozása széleskörűen tanulmányozott terület, mivel mindkét folyamat fontos szerepet játszik az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában. E két folyamat közötti kapcsolat is nyilvánvaló, mivel a megnövekedett MLC20 foszforiláció csak akkor eredményez barrier diszfunkciót, ha a stressz-kábelek képződéséhez elegendő polimerizált aktin (F-aktin) áll rendelkezésre. Az aktin polimerizációt és a miozin foszforilációt szabályozó tényezők azonban még nincsenek teljesen feltárva. Felvetődik annak a lehetősége, hogy a CN az aktin polimerizációt és a miozin foszforilációt szabályozó enzimek foszforiláltsági szintjét befolyásolhatja. Irodalmi adatok alapján a CN/PP2B befolyásolja az endotél barrier funkciót és a citoszkeletális fehérjék foszforilációját, azonban az enzim e funkcióinak molekuláris mechanizmusa még nem ismert.

Mindezek alapján kutatási célkitűzéseink az alábbi kérdések tanulmányozásához kapcsolódtak.

1. A calcineurin szerepének vizsgálata marha tüdő artéria endotél sejtek aktin citoszkeleton szerkezetének szabályozásában calcineurin gátlók (CsA, ill. FK506) alkalmazásával, ill. a sejtek CNA/pEGFP konstrukciókkal történő transzfekciójával.
2. Részt vesz-e a calcineurin a miozin foszfátáz gátlását okozó foszforilált MYPT1^{Thr696} és MYPT1^{Thr853} oldalláncainak defoszforilációjában, azaz a miozin foszfátáz aktivitásának szabályozásában?
3. A MYPT1 és a calcineurin kölcsönhatásának jellemzése, a kölcsönhatás molekuláris hátterének feltárása.
4. Milyen szerepe lehet a calcineurin és MYPT1 kölcsönhatásának az endotél sejtek fiziológiai funkcióinak szabályozásában?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fehérjék

A csirke zúza 133 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (teljes hosszúságú) és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (C-terminális fragment) fehérjéket és a csirke zúza 130 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő His-MYPT1¹⁻⁶³³, His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ N-terminális fragmentumokat *Escherichia coli* sejtekben expresszáltuk és ezt követően affinitás kromatográfiás módszerekkel tisztítottuk. PP1c, PP2Ac és inhibitor-2 fehérjéket nyúl vázizomból preparáltunk, a CN-t marha agyból tisztítottuk.

Sejtkultúrák, sejtek kezelése és transzfekciója

Kísérleteinkben marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC, Bovine Pulmonary Atery Endothelial Cells); humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC, Human Pulmonary Atery Endothelial Cells) és tsA201 (humán embrionális vese) sejteket használtunk. Az effektorokkal való kezelésekhöz az EC-t 100% konfluenciáig tenyésztettük, majd a sejteket szérum-mentes médiumban kezeltük. A tsA201 és BPAEC sejteket 60-70%-os konfluencia eléréséig szövettenyésztő edényekben növesztettük, majd pEGFP, CNA alegység és a Flag-MYPT1 expressziós plazmidokkal transzfektáltuk, ill. pEGFP és ΔCNA-pEGFP, vagy Flag-MYPT1 és a CNAα-pEGFP plazmidokkal kotranszfektáltuk a jetPEI vagy Eugene HD transzfekciós reagenseket használva.

Western blot

A BPAEC, HPAEC és tsA201 sejtekből nyert fehérjéket 10-20% akrilamidot tartalmazó SDS-PAGE gélen választottuk el és a gélről a fehérjéket elektroblottolással nitrocellulóz membránra vittük át immunológiai azonosítás céljából. Blokkolást követően a membránokat először primer, majd HRP-konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk, és az immunreakciókat ECL reagenssel detektáltuk.

Pull-down kísérletek

A tsA201 sejtek transzfekcióját követően (Flag-MYPT1 vagy Flag-MYPT1 és CNAα-pEGFP plazmidokkal) 36-48 órás poszttranszfekciós idő elteltével felkapartuk, centrifugálással összegyűjtöttük és lizáltuk. A lizátumot anti-Flag gyantával inkubáltuk és a kötött fehérjéket SDS-mintapufferrel történő forralással szolubilizáltuk. A mintákat anti-

MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-CNA α , anti-PP1c δ és anti-GFP antitestekkel vizsgáltuk Western blot analízissel.

A BPAEC és HPAEC-ek lizátumából a pull-down kísérleteket Flag-MYPT1-kapcsolt anti-Flag gyantával végeztük el. A Flag-MYPT1-et tsA201 sejtek lizátumából tisztítottuk és a kapcsolódó fehérjéket 2 M LiBr/TBS-el való mosással távolítottuk el. Az így nyert Flag-MYPT1 gyantát BPAEC és HPAEC lizátumokkal inkubáltuk és a kötődő fehérjéket Western blot analízissel, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-CNA α , anti-PP1c δ antitestek segítségével azonosítottuk.

A GST-MYPT1 pull-down kísérleteket BPAEC lizátumokkal végeztünk. A sejtfeltárást követően a Glutation-Sepharose gyantához GST-t vagy GST-MYPT1-et kapcsoltunk. A BPAEC sejtizátumot kapcsolatlan Glutation-Sepharose gyantával előtisztítottuk, majd a GST-vel (kontroll) vagy GST-MYPT1-gyel kapcsolt Glutation-Sepharose-zal inkubáltuk. A gyanta által kötött fehérjéket SDS-mintapufferrel történő forralással szolubilizáltuk és a CN kötődését anti-CNA α antitesttel, Western blot analízissel detektáltuk.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A protein foszfatáz aktivitás meghatározását tisztított PP1c-vel, PP2Ac-vel és CN-al végeztük ³²P-GST-MYPT1-et használva szubsztrátként. A GST-MYPT1 fehérjét ROK-al foszforiláltuk és a ³²P-GST-MYPT1 szubsztrátból a foszfatázokkal történő különböző inkubációs idők után felszabaduló ³²P_i-t mértük a fehérjék triklór-ecetsavval történő kicsapását és centrifugálást követően a felülúszóból.

Felületi plazmon rezonancia

A CN és a MYPT1 fragmentumok kölcsönhatásának vizsgálatára felületi plazmon rezonancia (SPR) méréseket végeztünk Biacore 3000 készülékkel. CM5 szenzor chip felületére a fehérjéket anti-GST antitesten keresztül (GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴, GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) vagy közvetlenül, a fehérjék (His-MYPT1¹⁻⁶³³, His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹) szabad amino-csoportjainak kapcsolásával immobilizáltuk. A kölcsönható molekulákat (CN és/vagy PP1c) különböző koncentrációkban a felszínre injektáltuk és azok kötődését az immobilizált fehérjékhez a rezonancia jel (RU) növekedéseként regisztráltuk az idő függvényében. Az így kapott görbéket (szenzogrammok) BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével analizáltuk a kinetikai és egyensúlyi paraméterek meghatározására.

Transzendotél elektromos ellenállás (TER)

Az EC barrier funkcióját a transzendotéliális ellenállás (TER) mérésével (electrical cell-substrate impedance sensing system, ECIS, Applied Biophysics, Troy, NY, USA) tanulmányoztuk. A teljes monolayer elektromos ellenállását mértük a kitapadó sejtek felszíne és az arany elektródok közötti ellenállás meghatározásával.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A BPAEC és HPAEC sejteket fedőlemezen 100 %-os konfluencia eléréséig növesztettük és különböző effektorokkal kezeltük. A lemezeket PBS-sel mostuk, a sejteket 4 % PFA-val fixáltuk, és 0,05 % Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel permeabilizáltuk, majd 1 % BSA/PBS-sel blokkoltuk. A sejteket 0,1 % BSA/PBS-ben hígított primer antitestekkel, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl vagy Alexa 543-konjugált anti-egér szekunder antitesttel inkubáltuk. Mosást követően a fedőlemezeket Prolong Gold Antifade médium segítségével a tárgylemezekre rögzítettük és Nikon Eclipse TE300 fluoreszcens mikroszkóppal vagy Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóppal elemeztük. A fehérjék kolokalizációjának a mértékét a Pearson-féle korrelációs koeficiens (C értékek) meghatározásával adtuk meg, a CN-A α -nak és a MYPT1-nek megfelelő zöld és piros csatornák pixel intenzitásának analízise alapján.

Áramlási citometriai analízisek

A BPAEC esetében a transzfekciók hatékonyságának és a kezelések citotoxikus hatásának a megítélésére, valamint az MLC20^{Ser19} foszforilációs szintjének meghatározásához áramlási citometriai analíziseket végeztünk FACS Calibur készülékkel (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA).

Intracelluláris Ca²⁺ mérés

BPAEC-eket steril üveg fedőlemezeken 100%-os konfluenciáig növesztettük majd Fura-2 fluoreszcens Ca²⁺-szenzitív festékkel inkubáltuk DPBS-ben. A méréseket DPBS-ben Ca²⁺ jelenlétében vagy távollétében, ez utóbbi esetben 10 mM EGTA egyidejű alkalmazásával, szobahőmérsékleten végeztük. A sejtek fluoreszcenciáját Ca²⁺-imaging rendszerrel mértük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

CN inhibitorok hatása a trombin-indukált stressz-kábel képződésre

A CN farmakológiai inhibitorait (CsA vagy FK506) felhasználva, valamint trombin kezeléseket alkalmazva vizsgáltuk az EC aktin citoszkeleton szerkezetének változásait. Trombin kezelés a BPAEC citoszkeleton szerkezetében drasztikus változásokat okozott: fokozott aktin polimerizációt és stressz-kábel képződést indukált, amely vaszkuláris barrier diszfunkció kialakulásához vezet. A trombin kimosásával ez a folyamat visszafordítható. CN gátlószerek (CsA és FK506) jelenlétében azonban a trombin hatására kialakult citoskeletális változások fennmaradnak. Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy a CN-nak fontos szerepe van a trombin kezelést követő barrier funkció helyreállításában, azaz az enzim aktiválása elősegíti a stressz-kábelek mennyiségének csökkenését és az aktin-citoszkeleton szerkezetének a trombin kezelést megelező állapotba történő visszarendeződését BPAEC-ben.

A CNA izoformák overexpressziójának hatása a citoszkeleton trombin-indukált szerkezeti változására

A GFP (kontroll) és a GFP-CNA izoformák (CNA α , β , γ) overexpressziója, sem a kezeletlen, sem a trombin-kezelt sejtekben nem befolyásolták az EC aktin-citoszkeleton szerkezetét. Ezzel szemben a CNA konstitutív aktív, rövidített α izoformáját (Δ CNA) kódoló plazmid transzfekciója, amelyből hiányzik az autoinhibitor (AI) és a CaM-kötő domént kódoló szekvencia, trombin kezelést követően csökkentette a transzfektált sejtekben a stressz-kábelek számát. Ez a CN szerepét jelzi az aktin-citoszkeleton szerkezeti változások szabályozásában, azonban a folyamat molekuláris hátterének feltárása további kísérleteket igényelt.

CN inhibitorok hatása a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjére EC-ben

CsA és FK506 szignifikánsan növelte a MYPT1 két, miozin foszfatáz gátlást okozó, Thr696 és Thr853 oldalláncainak foszforilációs szintjét BPAEC és HPAEC-ben is. ROK inhibitor (H1152) a kezeletlen és a CsA-val kezelt sejtekben is jelentősen csökkentette a foszforilált MYPT1^{Thr696} (MYPT1^{pThr696}) és MYPT1^{Thr853} (MYPT1^{pThr853}) szintjét is, amely a foszforilációs folyamat ROK-függő jellegére utal.

Izolált enzimekkel végzett *in vitro* foszfatáz aktivitásmérések bizonyították, hogy a CN Ca^{2+} /CaM- és koncentráció-függő módon közvetlenül defoszforilálja a foszfo-MYPT1-et,

a PP1c és PP2Ac katalitikus alegységekhez hasonló kinetikával. Az endogén MYPT1^{pThr696} defoszforilációja tsA201 sejtekben overexpresszált, konstitutív aktív CN hatására is bekövetkezik. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a CN közvetlenül defoszforilálja a MYPT1-et, azaz a CN a MYPT1 Ca²⁺/CaM-függő foszfatáza.

CsA hatása az EC [Ca²⁺]_i szintjére és a kofilin foszforilációjára

BPAEC sejtek CsA kezelése gyors, átmeneti [Ca²⁺]_i emelkedést indukál, amely az inkubációs periódus végén is meghaladja a kezeltlen sejtek [Ca²⁺]_i szintjét. A CsA hatása függ az extracelluláris Ca²⁺ jelenlététől, amely plazmamembrán Ca²⁺ csatorna (vagy csatornák) szerepét feltételezik az [Ca²⁺]_i növekedésében. Kimutattuk, hogy extracelluláris Ca²⁺ távollétében (EGTA jelenlétében) a CsA MYPT1^{pThr696} szintet növelő hatása nem figyelhető meg. Feltételezzük, hogy az emelkedett [Ca²⁺]_i a CN aktivációjával párosul, ami fokozott MYPT1^{pThr696} defoszforilációt tesz lehetővé, amelyet azonban a CsA jelenléte és gátló hatása ellensúlyoz. Irodalmi adatokkal összhangban az is valószínű, hogy a megnövekedett [Ca²⁺]_i-nak szerepe van a ROK aktiválásában is.

A [Ca²⁺]_i és a CN aktivitás növekedését összefüggésbe hozták az aktint depolimerizáló faktor kofilin Ser3 oldallánca foszforilációs szintjének szabályozásával is. HeLa sejtekben a CN aktiválja a foszforilált kofilin defoszforilációját katalizáló Slingshot foszfatázt. CsA kezelést követően mind BPAEC- és HPAEC-ben növekedett a kofilin^{pSer3} szintje, amely megerősíti a CN feltételezett szabályozó szerepét a kofilin^{pSer3} szint szabályozásában. A kofilin foszforilációja csökkenti a fehérje aktint depolimerizáló aktivitását elősegítve az F-aktin mennyiségének növekedését. Az [Ca²⁺]_i CsA által indukált növekedése a kofilin foszforilációjáért felelős kináz, a LIMK aktivációjával is összefüggésbe hozható, feltehetően a RhoA/ROK útvonal aktiválásával, ami szintén hozzájárulhat a kofilin^{pSer3} szintjének növekedéséhez.

A CN és a MYPT1 kölcsönhatása *in vivo* és *in vitro*

Kimutattuk a BPAEC és HPAEC sejtek lizátumában jelen lévő endogén CN kölcsönhatását foszforilálatlan GST-MYPT1 vagy Flag-MYPT1 fehérjékkel pull-down kísérletekben. Ezek az eredmények azt sejtették, hogy a MYPT1 foszforilációja nem előfeltétele a CN-MYPT1 komplex képződésének. A két fehérje kölcsönhatását koexpressziót követő pull-down kísérletekkel is megerősítettük. Fluoreszcens and konfokális mikroszkópia alkalmazásával kimutattuk, hogy az endogén CN és a MYPT1 kismértékben a sejtmagban, nagyobb mértékben az EC-ek citoplazmájában lokalizálódott. A két fehérje kolokalizációját a

citoplazmában és a sejtmagban is detektáltuk, amely hasonló mintázatot mutatott kezeletlen és trombin kezelt BPAEC/HPAEC sejtekben is. A két fehérje nagymértékű kolokalizációjára utalt a Pearson-féle korrelációs koefficiensek meghatározása is, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a CN és MYPT1 asszociációja sejtszinten is bekövetkezik.

SPR kötődési kísérletekben tisztított MYPT1 fehérjék (teljes hosszúságú, valamint N- és C-terminális fragmentumok) alkalmazásával feltérképeztük a MYPT1 lehetséges CN-t kötő régióit és meghatároztuk a képződő komplexek stabilitását. Az adatokból arra következtettünk, hogy a MYPT1 és a CN stabil komplexet alkot ($K_a \sim 10^7$). A CN-MYPT1 interakcióban a MYPT1 N-terminális régiói játszanak szerepet és ezzel összhangban itt található a CN szubsztrátjaira jellemző, az azok CN-hoz való kötődéséhez szükséges P_XI_XIT szekvencia motívuma (³⁰⁰PLIEST³⁰⁵) is, amely elősegíti a kölcsönhatás stabilizációját. A PP1c szintén a MYPT1 N-terminális szakaszaihoz kötődik, azonban SPR és pull-down kísérletekkel is igazoltuk, hogy a PP1c és a CN között nincs kompetíció a MYPT1-hez történő kötődés során. A CN és MYPT1 PP1c-től független, stabil kölcsönhatásából arra következtettünk, hogy a CN és a miozin foszfatáz holoenzimmel is hasonló stabilitású komplexet képez, mint a MYPT1-el.

A CN és a MYPT1 kölcsönhatás szerepe az EC miozin foszforilációjában és a barrier funkció szabályozásában.

Előzetes irodalmi adatok alapján a trombin tranziens MLC20/miozin foszforilációt eredményez, ami átmeneti MP gátlással párosul. Feltevésünk az volt, hogy a CN gátlásával fenntartott MYPT1 gátló foszforiláció alakulhat ki, ami fokozott miozin foszforilációval párosulhat. Eredményeink szerint a trombin kezelés után tranziensen növekszik a MYPT1^{Thr696} és a MLC20^{Ser19} foszforilációja is. Ezzel szemben, amikor az EC-t CsA-val előkezeltük a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének jelentős növekedését tapasztaltuk, amely viszonylag magas szinten részlegesen fenntartott maradt a trombin kezelés időtartama alatt. Ezzel párhuzamosan a MLC20^{pSer19} szintjének növekedését is detektáltuk. Eredményeink olyan szabályozási mechanizmusra utalnak, amelyben a CN ellensúlyozza a MYPT1 gátló hely(ek) foszforilációját, amely a MP-t aktív állapotban tartja, ezzel is csökkentve a MLC20^{pSer19} szintjét. A trombin által előidézett $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés, amely aktiválja a MLCK-t és a CN-t, tranziens MLC20 foszforilációt és MP gátlást eredményez. Ezzel szemben a CN gátlása trombin kezelése során megszünteti a foszforilációs változásokat. Átmeneti (tranziens) jelleget és fenntartott MYPT1 és MLC20 foszforilációhoz vezet. A CN szerepe tehát a MYPT1^{pThr696} defoszforilációjában alapvető, de feltehetően nem kizárólagos, ami

összhangban van a foszforiláció CsA jelenlétében tapasztalt részben fenntartott jellegével. Felmerülhet más foszfatázok, így pl. PP1 és a PP2A típusok szerepe is a MYPT1 defoszforilációjában, amely feltevésessel *in vitro* foszfatáz aktivitásmérési adataink is összhangban vannak. Hangsúlyozni kell azonban, hogy kísérleteinkben a PP1c és PP2Ac MYPT1-et defoszforiláló hatását bizonyítottuk, a sejtekben viszont ezek a katalitikus alegységek holoenzim formában vannak jelen, ezért az enzimeket a MYPT1-hez irányító regulátor alegységek azonosítása a további kutatások fontos kérdése.

A CN gátlás hatása az EC barrier funkciójára

Ismert, hogy a CN gátlószerek (CsA, FK506, deltametrin) befolyásolják az EC permeabilitását. Kimutatták, hogy az FK506 önmagában nem változtatta meg a TER-t, de megakadályozta az EC regenerálódását a trombin-indukált rezisztencia csökkenést követően, míg a PP1 és PP2A gátlószerek e tekintetben hatástalannak bizonyultak. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a CN gátlása CsA-val csökkenti a TER-t BPAEC-ben, azonban szignifikáns változást az MLC20 foszforilációs szintjében nem detektáltunk. Feltételezésünk szerint ez a CsA okozta TER változás a kofilin^{pSer3} megnövekedett szintjének tulajdonítható, ugyanis a CsA kezelés hatására emelkedett a kofilin^{pSer3}, ami fokozott aktin polimerizációhoz, és az aktin-citoszkeleton szerkezetváltozása által EC permeabilitás növekedéshez vezethet. CsA előkezelés trombin hozzáadását megelőzően jelentősen lassítja a TER értékének kontroll szintre történő visszatérését, azaz a barrier funkció helyreállítását BPAEC-ben, amit feltehetően a fenntartott MYPT1^{pThr696} és MLC20^{pSer19} foszforilációs szint okozhat. Eredményeinkből tehát arra következtethetünk, hogy a CN gátlása CsA-val mind az MLCK-függő és MLCK-független jelátviteli útvonalakra is hatással van EC-ben.

AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Kimutattuk, hogy a kalcineurin aktiválása elősegíti a trombin-indukált stressz-kábelek számának csökkenését, míg a kalcineurin gátlószerek ellentétes hatást fejtenek ki. Eredményeink alapján a kalcineurin aktivitása a citoszkeleton szerkezeti változásain keresztül befolyásolhatja a sejtek kontraktilitását.
- Munkánk során, a miozin foszfatáz MYPT1 alegysége Thr696 és Thr853 gátló foszforilációs helyeinek defoszforilációjában részt vevő protein foszfatázként a kalcineurint azonosítottuk.

- Feltártuk a defoszforilált MYPT1 és a kalcineurin kölcsönhatás szerkezeti hátterét. A kalcineurin és a defoszforilált MYPT1 stabil komplexet alkot, ami arra utal, hogy ezen fehérjék kölcsönhatásának az enzim-szubsztrát kapcsolaton túl más biológiai funkciója is lehet, így pl. a kölcsönhatás elősegítheti kolokalizációjukat fiziológiai szempontból fontos szignalizációs komplexekben.
- Eredményeink arra utalnak, hogy a kalcineurin fontos szerepet játszik az EC trombin által indukált diszfunkciójának regenerálódási folyamatában, feltehetően a miozin foszfatáz MYPT1 alegység defoszforilációval történő aktiválásával, amely a miozin foszforiláció csökkenését okozza.

Iktatószám: DEENKÉTK/275/2012.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kolozsvári Bernadett

Neptun kód: DADHZV

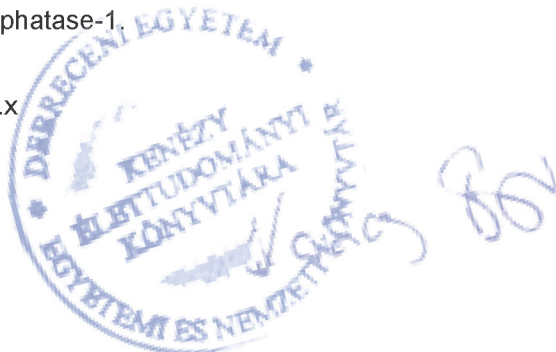
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kolozsvári, B.**, Bakó, É., Bécsi, B., Kiss, A., Czikora, Á., Tóth, A., Vámosi, G., Gergely, P., Erdődi, F.:
Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase.
Cardiovasc. Res. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs255>
IF:6.064 (2011)
2. **Kolozsvári, B.**, Szijgyártó, Z., Bai, P., Gergely, P., Verin, A., Garcia, J.G.N., Bakó, É.: Role of calcineurin in thrombin-mediated endothelial cell contraction.
Cytometry A. 75 (5), 405-411, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20707>
IF:3.032

További Közlemények

3. Kiss, A., Bécsi, B., **Kolozsvári, B.**, Komáromi, I., Kövér, K.E., Erdődi, F.: Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-d-glucose inhibit protein phosphatase-1.
FEBS J. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08498.x>
IF:3.79 (2011)



4. Matta, C., Juhász, T., Szíjgyártó, Z., **Kolozsvári, B.**, Somogyi, C., Nagy, G., Gergely, P., Zákány, R.: PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures.
Biochimie. 93 (2), 149-159, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.005>
IF:3.022
5. Juhász, T., Matta, C., Mészár, Z., Nagy, G., Szíjgyártó, Z., Molnár, Z., **Kolozsvári, B.**, Bakó, É., Zákány, R.: Optimized transient transfection of chondrogenic primary cell cultures.
Cent. Eur. J. Biol. 5 (5), 572-584, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-010-0053-x>
IF:0.685

Összesített impakt faktor: 16.593

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 9.096

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.09.11



FÜGGELÉK

Előadások és poszterek az értekezés témájában:

Előadások:

Kolozsvári Bernadett: A calcineurin szerepe a miozin foszfatáz szabályozásán keresztül, az endotél diszfunkcióban, 42. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2012

Kolozsvári Bernadett: The role of calcineurin in the regulation of myosin phosphatase, Regional PhD Student Scientific Conference University of Debrecen, Gallyatető, Hungary, 2011

Kolozsvári Bernadett: The role of calcineurin in the regulation of myosin phosphatase in endothelial cells, PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, Hungary, 2010

Kolozsvári Bernadett: Kalcium-függő foszforilációs/defoszforilációs folyamatok szerepe a tüdő endotél sejtek citoszkeletonjának szabályozásában, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Budapest, 2009

Kolozsvári Bernadett: The role of calcineurin in the regulation of the cytoskeleton structure of endothelial cells, PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, Hungary, 2007

Poszterek:

Bernadett Kolozsvári, Andrea Kiss, Bálint Bécsi, Ferenc Erdődi, Pál Gergely, Éva Bakó: The role of calcineurin in human and calf pulmonary artery endothelial dysfunction by the regulation of myosin phosphatase, „From molecules to life and back” FEBS3+ meeting 2012 conference, Opatija, 2012

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Bécsi Bálint, Vámosi György, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: A calcineurin szerepe a miozin foszfatáz szabályozásán keresztül, az endotél diszfunkcióban, 42. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2012

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: A miozin foszfatáz szabályozása calcineurin-katalizált MYPT1 defoszforilációjával, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, 2011

Bernadett Kolozsvári, Andrea Kiss, Bálint Bécsi, Ferenc Erdődi, Pál Gergely, Éva Bakó: The role of calcineurin in endothelial dysfunction by the regulation of myosin phosphatase, FASEB Europhosphatase 2011 conference, Baden, 2011

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: A calcineurin szerepe a MP szabályozásán keresztül az endotél diszfunkcióban, 41. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: A calcineurin szerepe a miozin foszfatáz szabályozásában endotél sejtekben, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Budapest, 2010

Bernadett Kolozsvári, Andrea Kiss, Bálint Bécsi, Ferenc Erdődi, Pál Gergely, Éva Bakó: The role of calcineurin in the regulation of myosin phosphatase in endothelial cells, FASEB Summer Research Conference Protein Phosphatases conference, Snowmass Village, Colorado, 2010

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: A kalcineurin szerepe a miozin foszfátáz szabályozásában endotél sejtekben, 40. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2010

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: Fehérje foszforilációs/defoszforilációs folyamatok szerepe a tüdő endotél sejtek (BPAEC) citoszkeletonjának szabályozásában, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Budapest, 2009

Bernadett Kolozsvári, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi, Pál Gergely, Éva Bakó: Role of protein phosphorylation processes in the regulation of actin-myosin interaction in pulmonary endothelial cells, EMBO Europhosphatase conference, Egmond aan Zee The Netherlands, 2009

Kolozsvári Bernadett, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Bakó Éva: Fehérje foszforilációs folyamatok szerepe az aktin-miozin kölcsönhatás szabályozásában tüdő endothel sejtekben, 39. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2009

Kolozsvári Bernadett, Sziogyártó Zsolt, Gergely Pál, Bakó Éva: Fehérje foszforilációs folyamatok szerepe a citoszkeleton szerkezetének szabályozásában tüdő endotél sejtekben (BPAEC), Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Szeged, 2008

Kolozsvári Bernadett, Sziogyártó Zsolt, Gergely Pál, Bakó Éva: A kalcineurin szerepe az endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, 38. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2008

Kolozsvári Bernadett, Bakó Éva: A kalcineurin szerepe a tüdő artéria endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Debrecen, 2007

Kolozsvári Bernadett, Bakó Éva, Gergely Pál: A PP2B/kalcineurin szerepe az endotél sejtek aktin citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, 37. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2007

Kolozsvári Bernadett, Bakó Éva: The role of protein phosphatase 2B (PP2B) in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure, PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, Hungary, 2007

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

