

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A calcineurin szerepe a miozin foszfatáz és az endotél
barrier funkció szabályozásában**

Kolozsvári Bernadett

Témavezető. Dr. Bakó Éva



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
Az endotél barrier funkció jelentősége	10
Barrier funkciót szabályozó foszforilációs/defoszforilációs folyamatok	11
<i>Fehérje foszforiláció és defoszforiláció jelentősége</i>	<i>11</i>
<i>A protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük</i>	<i>11</i>
<i>Sejt-sejt közötti kapcsolatok szabályozása foszforilációval/defoszforilációval</i>	<i>12</i>
<i>Citoszkeletális fehérjék foszforilációjának szabályozása</i>	<i>14</i>
<i>Az endotél MLCK és a MLC20 foszforiláció</i>	<i>16</i>
Miozin foszfatáz szerkezete és szabályozása	16
<i>A miozin foszfatáz holoenzim felépítése</i>	<i>16</i>
<i>A miozin foszfatáz szabályozása</i>	<i>18</i>
A kalcineurin szerkezete és szabályozása	20
<i>A kalcineurin szerkezete</i>	<i>20</i>
<i>A kalcineurin szabályozása</i>	<i>22</i>
<i>A kalcineurin inhibitorai</i>	<i>23</i>
<i>A kalcineurin szerepe a barrier funkció szabályozásában</i>	<i>24</i>
CÉLKITŰZÉSEK	25
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
Anyagok	26
<i>Vegyszerek</i>	<i>26</i>
<i>Antitestek, fehérjék</i>	<i>26</i>
<i>Oligonukleotid primerek</i>	<i>27</i>
Módszerek	27
<i>Plazmid preparálás</i>	<i>27</i>
<i>Sejtkultúrák</i>	<i>28</i>

<i>Sejtek tenyésztése</i>	28
<i>BPAEC és HPAEC sejtek kezelése effektorokkal</i>	29
<i>Transzfekció</i>	29
<i>Western blot</i>	29
<i>Pull-down kísérletek</i>	30
<i>Protein foszfatáz aktivitás meghatározása</i>	31
<i>Intracelluláris Ca²⁺ mérés</i>	31
<i>Transzendentél elektromos ellenállás (TER)</i>	32
<i>Felületi plazmon rezonancia</i>	32
<i>Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia</i>	33
<i>Áramlási citometriai analízisek</i>	33
<i>Adatok elemzése, kiértékelése</i>	35
EREDMÉNYEK	37
A CN szerepe a trombin-indukált aktin-citoszkeleton átrendeződésben	37
<i>CN inhibitorok hatása a trombin-indukált stressz-kábel képződésre</i>	37
<i>A CNA izoformák overexpressziójának hatása a trombin-indukált citoszkeleton szerkezeti változásokra</i>	38
A CN szerepe a MP MYPT1 alegységének defoszforilációjában	41
<i>CN inhibitorok hatása a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjére EC-ben</i>	41
<i>A CN szerepe a MYPT1 közvetlen defoszforilációjában in vivo és in vitro</i>	43
<i>A CsA hatása az EC [Ca²⁺]_i szintjére BPAEC-ben</i>	45
<i>A CN szerepe a kofilin foszforilációs szintjének szabályozásában</i>	46
A CN és a MYPT1 kölcsönhatása in vivo és in vitro	47
<i>A CN és MYPT1 kölcsönhatás kimutatása EC és tsA201 sejtekben</i>	48
<i>A CN és MYPT1 kolokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával</i>	49
<i>A CN és MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálata felületi plazmon rezonancia mérésekkel</i> .	51
A CN és a MYPT1 kölcsönhatás szerepe az EC miozin foszforilációjában és a barrier funkció szabályozásában	53

<i>A CsA hatása a MYPT1 gátló foszforilációjára trombin jelenlétében.....</i>	<i>53</i>
<i>A CsA hatása a MLC20 foszforilációjára trombin jelenlétében.....</i>	<i>54</i>
<i>A CN gátlás hatása az EC barrier funkciójára.....</i>	<i>57</i>
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	59
<i>A CN szerepe az endotél sejtek trombin-indukált kontrakciójában</i>	<i>59</i>
<i>A CN szerepe a barrier diszfunkció szabályozásában a MP MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek defoszforilációjával.....</i>	<i>60</i>
ÖSSZEFOGLALÁS	65
SUMMARY.....	66
IRODALOMJEGYZÉK.....	67
TÁRGYSZAVAK.....	76
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
FÜGGELÉK	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[Ca ²⁺] _i	intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció
AID	autoinhibitor domén
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AJ	adherens junkciók
BPAEC	marha tüdő artéria endotél sejt
BSA	borjú szérum albumin
CaM	kalmodulin
CaMK-II	Ca ²⁺ /kalmodulin-függő protein kináz II
CDK	ciklin-függő kináz
CLA	kalikulin-A
CN	kalcineurin
CNA	kalcineurin katalitikus alegység
CNA α	kalcineurin katalitikus alegység alfa izoformája
CNA β	kalcineurin katalitikus alegység béta izoformája
CNA γ	kalcineurin katalitikus alegység gamma izoformája
Δ CNA	kalcineurin katalitikus alegység rövidített formája
CNB	kalcineurin regulátor alegység
CNBR1	kalcineurin-kötő régió 1
CNBR2	kalcineurin-kötő régió 2
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
CypA	ciklofilin A
CsA	ciklosporin A
DTT	ditiotritol
EC	endotél sejtek
ECL	nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló reagens
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGTA	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
ERK	extracelluláris szignál által szabályozott kináz
FN	fibronektin
FBS	marhaszérum
FKBP	FK506-kötő fehérje
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GST	glutation-S-transzferáz
GJ	gap junkciók
His	hexahisztidin
HPAEC	humán tüdő artéria endotél sejt
HRP	tormaperoxidáz
HSP27	hősokk fehérje 27
IL-2	interleukin-2
ILK	integrinhez kötődő kináz
LiBr	lítium-bromid
LIMK	LIM-kináz
MAP	mikrotubulus-asszociált fehérjék
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz

M20	a miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége
MBP	maltózkötő fehérje
MC-LR	mikrocisztin-LR
MDPK	izom disztrófia protein kináz
MLC20	miozin 20 kDa könnyű lánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MP	miozin foszfatáz
MPH	miozin foszfatáz holoenzim
MYPT1	miozin foszfatáz regulátor alegység 1
NFAT	aktivált T-sejtek nukleáris faktora
NLS	sejtmagi lokalizációs szignál
OA	okadánsav
p120	p120-katenin
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PAK	p21-aktivált protein kináz
PBS	foszfát puffer, sóval pH 7,4 (Phosphate-buffered saline)
P _i	anorganikus foszfát
PECAM-1	vérlemezke endotél sejt adhéziós molekula
PFA	paraformaldehid
PAR-1	proteáz-aktivált receptor-1
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PKG	protein kináz G
PMA	forbolészter
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PNUTS	nukleáris foszfatáz célirányító alegység
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység
PP1cδ	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység δ izoformája
PP2A	protein foszfatáz-2A
PP2B	protein foszfatáz-2B, calcineurin
PP2C	protein foszfatáz-2C
PP1áz	peptidil-prolil izomeráz
PTX	pertúzis toxin
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
ROK	RhoA által aktivált kináz
ROS	reaktív oxigén gyökök
RU	rezonancia jel
Ser	szerin
SDS	nátrium-dodecilszulfát
SPR	felületi plazmon rezonancia
SSH	Slingshot foszfatáz
TBS	Tris-HCl puffer
TCA	triklór-ecetsav
TER	transzendentél elektromos ellenállás
Thr	treonin
TJ	szoros sejtkapcsolat
Tyr	tirozin

VE	vaszkuláris endoteliális
VEGF	vaszkuláris endotél növekedési faktor
Vin	vinkulin
VN	vitronektin
ZIPK	leucin-cipzárral kölcsönható kináz
ZO	zonula ocludens

BEVEZETÉS

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 megőrizzék az érfal szelektív barrier funkcióját a keringő vér és a környező szövetek között, ugyanakkor tegyék lehetővé bizonyos molekulák transzportját (Mehta és mtsai., 2006).

Fiziológiai stimulusokra és/vagy patológiás esetekben (pl. gyulladásoos, allergiás folyamatokban) az endotél egysejtréteg integritása megváltozhat, amely a sejtek közötti rések kialakulásához, ezzel a barrier funkció sérüléséhez és megnövekedett vaszkuláris permeabilitáshoz vezethet (Garcia és mtsai., 1995). A citoskeletonális fehérjéknek, valamint az intracelluláris sejt-kapcsoló struktúráknak fontos szerepe van a sejt-sejt közötti kapcsolatok és a barrier funkció koordinált szabályozásában (Dejana, 2004). Ezen fehérjék fiziológiai funkcióit szerin/treonin/tirozin (Ser/Thr/Tyr) oldalláncuk foszforilációja, ill. defoszforilációja is módosíthatja. Mindezek az adatok a foszforilációs szabályozás átalakító enzimeire, a protein kinázok és foszfatázok szerepére irányították a figyelmet az EC citoskeleton szerkezetének és a sejt-sejt kapcsolatok szabályozásának feltárásában (Csontos és mtsai., 2007).

Az aktin polimerizációja és citoskeletonális fehérjék (pl. aktin-kötő fehérjék és miozin) foszforiláltsági állapotának változása a citoskeleton elemeinek átrendeződését és kontraktilis mikrofilamentumok (aktin-miozin, stressz-kábelek) kialakulását eredményezi. Ezek a folyamatok a sejtek alakjának megváltozásához, sejtek közötti rések kialakulásához, és ezzel a vaszkuláris barrier funkció sérüléséhez vezetnek. Ezzel összhangban számos tanulmány igazolta, hogy a nem-izom miozin-II 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációs szintje az aktuális barrier funkció egyik fontos tényezője. Kimutatták például, hogy gyulladáskeltő effektorok (trombin, hisztamin) hatására a MLC20 foszforilációs szintje gyorsan emelkedik és ezzel párhuzamosan az endotél sejtek permeabilitása növekedik (Mehta és mtsai., 2006).

A MLC20 foszforilációját katalizáló enzimek közül a Ca^{2+} -kaldmodulin (Ca^{2+} /CaM)-függő MLC kináz (MLCK) endotél specifikus (Garcia és mtsai., 1997) formájának szerepe elsődleges jelentőségű, amelynek működési feltétele az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megfelelő szintű növekedésével kialakuló Ca^{2+} /CaM komplex kötődése (Wysolmerski és mtsai., 1990). A foszfo-MLC20 defoszforilációját a miozin foszfatáz (MP) katalizálja, amelyet a protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegység δ izoformája (PP1c δ), a

miozinhoz és a PP1c-hez egyaránt kötődő 130-133 kDa alegység (**my**osin **p**hosphatase **t**arget subunit-**1**, MYPT1) és egy, csak a MYPT1-hez kötődő 20 kDa fehérje alkot (Hartshorne és mtsai., 2004). A MP aktivitásának szabályozásában kulcsszerepet játszik a Thr696 és Thr853 oldalláncok RhoA által aktivált kinázzal (ROK) történő foszforilációja, amely az enzimaktivitás csökkenését okozza. Ismert, hogy e foszforilációban más kinázok is részt vehetnek (Hartshorne és mtsai., 2004), ezzel szemben a defoszforilációt katalizáló és ezzel az enzim aktivitását fiziológiai körülmények mellett fokozó protein foszfatázok kevésbé feltártak. *In vitro* vizsgálatok a protein foszfatáz-2A (PP2A) és a Ca^{2+} /CaM-függő kalcineurin (CN) -ez utóbbit protein foszfatáz-2B-nek (PP2B) is nevezik- szerepét feltételezik a MYPT1-foszfo-Thr696 (MYPT1^{pThr696}) és MYPT1-foszfo-Thr853 (MYPT1^{pThr853}) defoszforilációjában. A CN/PP2B szerepét az EC barrier funkciójának a szabályozásában is számos megfigyelés bizonyította. Kimutatták, hogy gátlása csökkenti a trombin kezelés következtében foszforilálódott citoskeletális fehérjék defoszforilációját, valamint a barrier funkció sérülés utáni regenerációját (Verin és mtsai., 1998).

Kísérleteink arra irányultak, hogy a CN/PP2B szerepét és hatásmechanizmusát az aktin-citoszkeleton szerkezeti változásokban megismerjük. Munkánk során tanulmányozni kívántuk a CN lehetséges szerepét az aktin polimerizáció és a MLC20 foszforilációjának szabályozásában. Kísérleteinkben elsősorban azon kérdés tanulmányozására koncentráltunk, hogy a CN részt vesz-e a MYPT1^{pThr696} (és a MYPT1^{pThr853}) defoszforilációjában és ezzel az MP aktivitás szabályozásában.

Eredményeink szerint a CN fontos szerepet játszik a barrier funkció fenntartásában és gátlása az aktin-citoszkeleton átrendeződését és barrier diszfunkciót indukál. A CN a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} Ca^{2+} -függő foszfatáza, defoszforilálja a MYPT1-et endotél sejtekben és ezzel szabályozza a MLC20 foszforiláció mértékét és az EC barrier funkcióját. E jelenségek felismerése egyben a barrier funkció befolyásolásának új farmakológiai lehetőségeire is ráirányítja a figyelmet.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az endotél barrier funkció jelentősége

Az erek belső falát borító endotélium szemipermeábilis barriert képez az erek lumene és az intersticium között, amely alapjául a sejtek szoros illeszkedése szolgál. Az EC kölcsönhatása a szomszédos sejtekkel és az extracelluláris mátrixszal (ECM) a normál barrier funkció betöltésében alapvető fontosságú (Dejana, 2004). Bioaktív ágensek (pl. trombin) hatására az egyensúly eltolódhat a kontraktilis erők irányába, amely az érfal homeosztázisának megbomlásához és sejtek közötti rések kialakulásához vezethet (Garcia és mtsai, 1995).

A kontraktilis erők kifejlődésében bizonyítottan szerepet játszanak a citoszkeleton aktin mikrofilamentumai és az aktomiozinon alapuló kontraktilitás, amely folyamatokat foszforiláció/defoszforiláció szabályozhat. Az aktin filamentumok megtalálhatóak minden eukarióta sejtben: részben a plazmamembrán közelében koncentrálnak kortikális polimerizált filamentumokat (F-aktin) alkotva, ahol komplex hálózatot képezve meghatározzák a sejtek alakját és motilitását. Az EC kontrakció során az aktin polimerizációja és a miozin foszforilációja aktin-miozin kontraktilis rostok, ún. stressz-kábelek kialakulásának is fontos tényezője. Kimutatták, hogy az aktin polimerizáció az aktin-citoszkeleton átrendeződésével növeli a mikroerek (kapillárisok) permeabilitását, amely tüdő ödéma kialakulásához vezet (Ermert és mtsai., 1995). Endotél sejtekben trombin kezelés hatására a kontrakcióval párhuzamosan növekszik az aktin polimerizációja (monomer G-aktinból F-aktin filamentumok alakulnak ki) (Ehringer és mtsai., 1999 és Mehta és mtsai, 2006) a kortikális aktin filamentumokban csökkenés, míg a stressz-kábelek mennyiségében egyidejű növekedés figyelhető meg (Schaphorst és mtsai., 1997). Ezzel szemben az aktin polimerizáció gátlása (cytochalasin D-vel vagy latrunkulinnal) megszünteti a kontraktilis választ (Goeckeler és mtsai., 2005).

Az EC egymáshoz való szoros illeszkedését, a sejt-sejt közötti kapcsolatokért felelős transzmembrán adhéziós fehérjéken keresztül a gap junkciók (GJ), szoros sejt-kapcsolatok (TJ) valamint az adherens junkciók (AJ) alakítják ki. A GJ-k transzmembrán csatornákat képeznek az egymással folytonosan illeszkedő sejtek között, míg a TJ-k és az AJ-k pericelluláris, foltszerű struktúrákat képeznek a szomszédos sejtek között. Az AJ-k fő integráns membránfehérjéi a vaszkuláris endoteliális (VE)-kadherineek, melyek Ca^{2+} -függő módon mediálják a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakulását. Ezzel összhangban kimutatták, hogy az

extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció csökkenése növeli az EC permeabilitását (Mehta és mtsai, 2006).

Barrier funkciót szabályozó foszforilációs/defoszforilációs folyamatok

Fehérje foszforiláció és defoszforiláció jelentősége

A fehérjék kovalens módosítása foszforiláció által számos sejtfolyamat, anyagcsere, osztódás, motilitás, differenciálódás, kontraktilitás, transzport szabályozásában kiemelkedő jelentőségű (Cohen, 1997). Az emlős sejteket alkotó fehérjék legalább egyharmada foszforilálható, összehangolt foszforilációjuk-defoszforilációjuk sokféle kináz és foszfatáz szabályozott működését igényli. A humán gének közel 500 protein kinázt kódolnak, amelyek mintegy kétharmada Ser/Thr oldalláncokat foszforilál, a fennmaradó enzimek pedig Tyr, vagy kettős specificitású kinázok (Cohen, 2002b). Ezzel szemben a protein foszfatázok családja (a katalitikus alegységeket tekintve) csak mintegy 150 tagot számlál, közülük 40 a Ser/Thr specifikus enzimek száma (Cohen, 2002c). Mindezek ellenére a foszfatázok szerepe a fehérjék foszforilációs szintjének kialakításában a protein kinázokéval egyenértékű, sőt egyes esetekben a fiziológiai válasz fenntartásában fontosabb szereppel is bírhatnak, mint a foszforiláló kinázok (Hunter, 1995). Munkánk fő célkitűzései a foszfo-(P)-Ser/Thr specifikus protein foszfatázok EC-ben betöltött szerepének tanulmányozásához kapcsolódik, ezért ezen enzimek főbb sajátosságait tekintjük át.

A protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük

A Ser/Thr specifikus foszfatázokat először biokémiai tulajdonságaik (gátló fehérjék és toxinok eltérő hatása, szubsztrátspecificitás, stb.) alapján osztályozták (Ingebritsen és mtsai., 1983) és (Cohen, 1989). Ezek szerint protein foszfatáz-1 (PP1) és -2 (PP2) típusokat különítettek el. A két típus közötti eltérés, hogy a PP1 enzimek aktivitását inhibitor fehérjék (inhibitor-1 és inhibitor-2), valamint a heparin gátolják, míg a PP2 enzimek aktivitására ezek az effektorok nincsenek hatással (Cohen, 2002a). A PP2 enzimek altípusai az aktivitáshoz extra fémion jelenlétét nem igénylő PP2A, a Ca^{2+} /CaM-függő PP2B (kalcineurin/CN) (Stewart és mtsai., 1982) és (Cohen, 1997), és a Mg^{2+} -függő PP2C (Ingebritsen és mtsai, 1983). Az okadánsav (OA), egy membránpermeábilis foszfatázgátló toxin, nem befolyásolja a PP2C aktivitását, csak nagy koncentrációban gátolja a CN-t, viszont hatékony, de eltérő gátló hatást fejt ki a PP2A-ra ($\text{IC}_{50} \sim 0,2\text{-}0,3 \text{ nM}$) és a PP1-re ($\text{IC}_{50} \sim 10\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$). A CN specifikus gátlószerei a ciklosporin A (CsA) és az FK506. A protein foszfatázok fiziológiás szerepének

megismerésében is alapvető fontosságú volt a foszfatázok aktivitását gátló toxinok felfedezése. Ezek a toxinok (OA, kalikulin-A, tautomycin, stb.) lipidoldékony molekulák, melyek képesek a sejtmembránon átdiffundálva gátló hatásukat kifejteni az endogén defoszforilációs folyamatokra. Ennek következtében megváltozik a protein kináz/protein foszfatáz aktivitás arány, amely a célfehérjék magasabb foszforilációs állapotát eredményezve kóros sejtválaszokat is indukálhat.

Sejt-sejt közötti kapcsolatok szabályozása foszforilációval/defoszforilációval

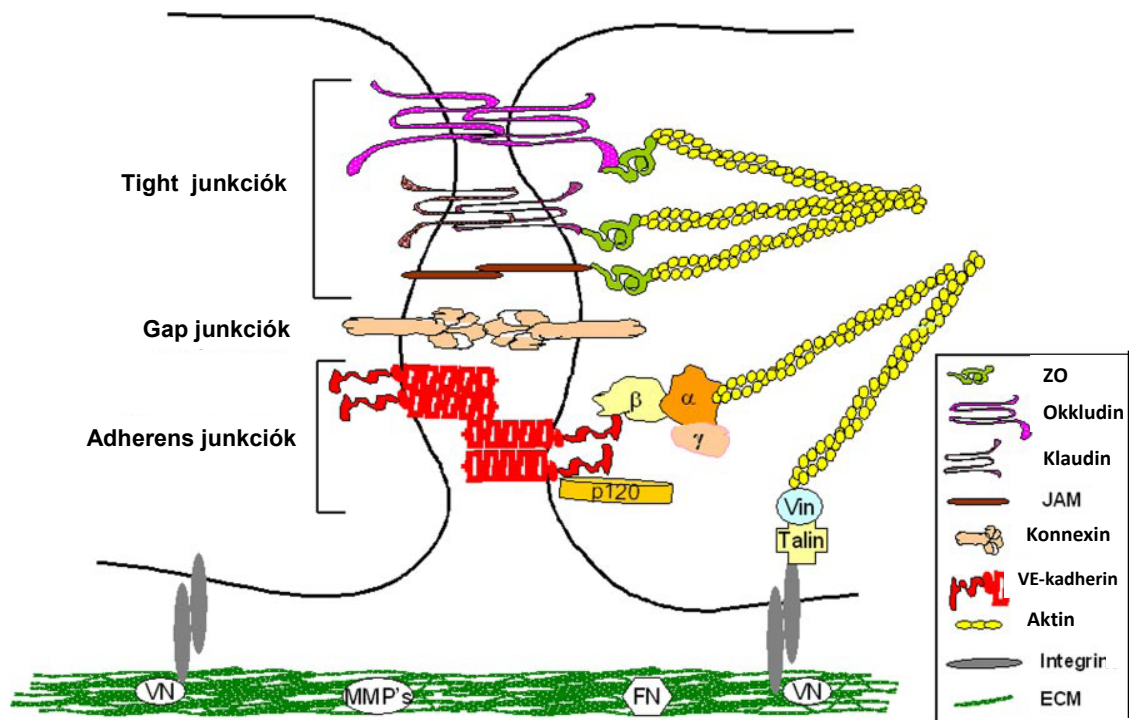
Az endotéliumban a sejtek közötti kommunikációs kapcsolatokban a transzmembrán fehérjék olyan intracelluláris fehérjékkel asszociálnak, amelyek elősegítik annak citoskeletális elemekhez való kötődését, ezáltal stabilizálják a sejt-sejt közötti kapcsolatokat. Az integráns membránfehérjék (pl. VE-kadherin, konnexin, okkludin, klaudin, PECAM-1) a citoplazmatikus oldalon intracelluláris kapcsoló fehérjéken keresztül (kateninek, aktinin, ZO-1) kapcsolódnak a citoskeletonhoz (F-aktin mikrofilamentumok, intermedier filamentumok). Az integrinek egyik feladata, hogy biztosítsák a kapcsolatot az ECM fehérjék (pl. fibronectin (FN), vitronectin (VN)) és az EC között (1. ábra).

A különböző sejtkapcsoló struktúrákat alkotó, transzmembrán adhéziós fehérjék, valamint a hozzájuk kapcsolódó intracelluláris fehérjék számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódhatnak. A TJ és AJ szerveződése pl. függ adott fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulásától, melyet e kölcsönhatásban résztvevő fehérjék foszforilációs állapota határozza meg. A fehérjék Ser/Thr és/vagy Tyr oldalláncainak foszforilációja módosíthatja a TJ-k és AJ-k szerkezetét, ezáltal fontos szerepet játszanak a paracelluláris permeabilitás kialakításában. Így pl. a VE-kadherin (AJ fehérje) egyes Ser oldalláncainak foszforilációja elősegíti intracelluláris partneréhez, a β -kateninhez való kötődését, viszont a β -katenin Tyr oldalláncainak foszforilációja csökkenti a VE-kadherinhez való affinitását (Huber és mtsai., 2001 és Roura és mtsai., 1999).

Kimutatták, hogy a VE-kadherin Tyr oldalláncainak foszforilációja gátolja a p120-hoz (szintén a katenin család tagja) és a β -kateninhez való kötődését, ezzel gátolva az EC barrier funkcióját (Potter és mtsai., 2005). Azt is igazolták, hogy a vérlemezke endotél sejt adhéziós molekula-1 (PECAM-1) modulálja a β -katenin Ser oldalláncainak foszforilációját és proteozómális degradációját (Biswas és mtsai., 2006).

A vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF) hatására növekszik az okkludin és a ZO-1 foszforilációs szintje, de eddig nem ismert, hogy pontosan mely oldalláncok

foszforilálódnak (Antonetti és mtsai., 1999). A TJ-ban az okkludint hiperfoszforilált formában mutatták ki és bizonyították, hogy lokalizációja foszforilációs folyamatok hatására megváltozik (Sakakibara és mtsai., 1997).



1. ábra: Az EC-ek intercelluláris, ill. extracelluláris mátrixhoz kapcsolódó kölcsönhatásainak szerkezeti sémája (Mehta és mtsai, 2006).

Kevés információt találunk azonban az irodalomban a TJ és AJ fehérjék defoszforilációjára vonatkozóan. Gyulladást kiváltó szerek pl. hisztamin és a VEGF csökkentik a p120 (p120-katenin) Ser/Thr oldalláncainak foszforilációját (Wong és mtsai., 2000). PP1 és PP2A gátlószerek OA és kalikulin A (CLA) a sejt-sejt kapcsolatok változását okozzák epidermális sejtekben, és azt találták, hogy hatásukra a β -katenin (β) Ser/Thr oldalláncainak foszforilációs szintje emelkedik (Serres és mtsai., 1997). Ismert, hogy epidermális sejtekben OA kezelés hatására a ZO-1 celluláris átrendeződése következik be (Singer és mtsai., 1994). A PP2A számos citoskeletális- és a citoskeletonhoz asszociált fehérjét defoszforilál, így például az intermedier filamentumokban a vimentin defoszforilációját katalizálja. Neuroblasztoma sejtekben a Rho-kináz foszforilálja a vimentint, melynek következtében a vimentin filamentumok felbomlanak, a folyamatot a PP2A reverzibilissé teszi (Nakamura és mtsai., 2000). A PP2A a mikrotubulusokkal és a MAP (mikrotubulus-asszociált fehérjék) fehérjékkel (pl. tau-val) kolokalizál (Kobayashi és mtsai.,

2001). Endotél sejtekben igazolták, hogy a PP2A gátlása az endotél sejtek motilitását az adhéziós komplex foszforilációján keresztül szabályozza, így pl. a paxillin fehérje hiperfoszforilációját eredményezi.

Citoszkeletális fehérjék foszforilációjának szabályozása

Számos citoszkeletális alkotórész és aktin-kötő fehérje foszforiláltsági állapota befolyásolja az EC aktuális alakját, egymáshoz való illeszkedésüket. Ezek közül az aktin és miozin fontosságára az is felhívja a figyelmet, hogy e két fehérje az EC teljes fehérjekészletének kb. 16%-át teszik ki (Wong és mtsai., 1990).

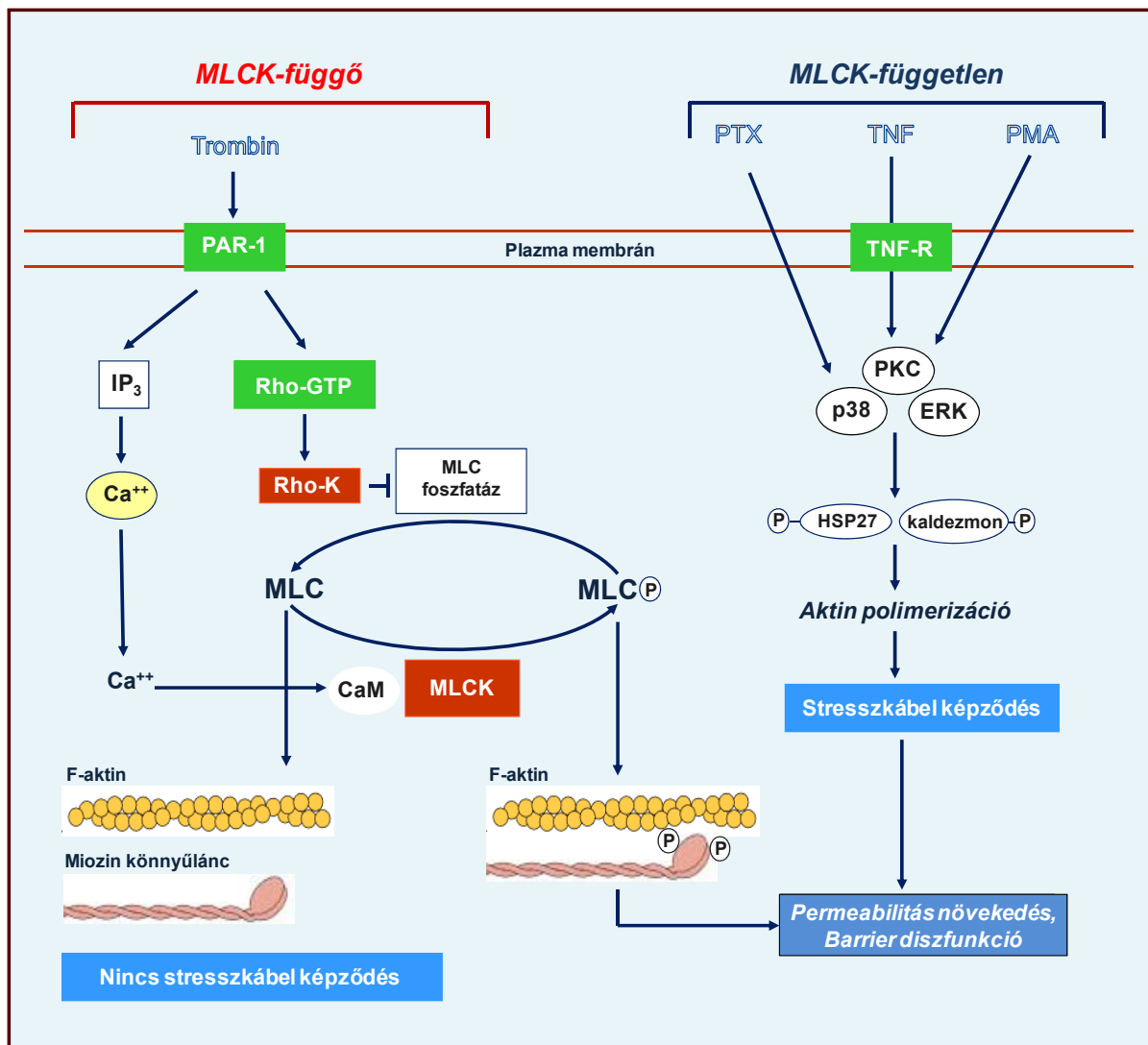
Endotél modell rendszerben számos tanulmány kimutatta, hogy trombin kötődése PAR-1 receptorhoz $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéssel jár, és az ezáltal kialakuló Ca^{2+}/CaM komplex kötődése aktiválja a MLC20 foszforilációját katalizáló MLCK-t (MLCK-függő útvonal). Szintén trombin hatására, a Rho/Rho-kináz útvonal aktiválásával kialakuló MP gátlás (ld. később a mechanizmust) is hozzájárulhat a MLC20 foszforilációs szintjének növekedéséhez (Totsukawa és mtsai., 2000) (2. ábra).

A MLCK-től független jelátviteli mechanizmus is növelheti az aktin polimerizációt és stressz-kábel képződést, pl. a pertussis toxin (PTX)/p38 mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonalon keresztül a HSP27 foszforilációjának fokozásával. Marha tüdő artéria endotél sejtekben (BPAEC) bizonyították, hogy forbolészter (PMA) kezelés hatására a protein kináz C (PKC) aktiválódik, és ennek hatására növekszik az aktin polimerizációja és az EC permeabilitása, anélkül, hogy a MLC20 foszforilációs szintje szignifikánsan emelkedne. Feltehetően ehhez hozzájárul az extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK) által katalizált kaldezmon foszforiláció és az azt követő aktin-miozin átrendeződés (Garcia és mtsai, 1995) (2. ábra).

Az aktin-kötő fehérjék szerepét (pl. spektrin, α -aktinin, filamin, kortaktin, kaldezmon, kofilin) az aktin-citoszkeleton szerkezetének szabályozásában széles körben tanulmányozták (Garcia és mtsai, 1995 és Garcia és mtsai., 1999), amelyek közül itt csak a kofilin szerepének ismertetésére kerül sor.

A kofilin az aktin polimerizációját befolyásoló fehérje és ezen aktivitása foszforilációval szabályozható. Defoszforilált állapotban az aktinhoz kötődik és elősegíti az aktin filamentumok depolimerizációját, míg Ser3 oldalláncának LIM-kinázzal (LIMK 1 és 2) (Yang és mtsai., 1998) történő foszforilációját követően aktin-kötő és depolimerizációs képessége jelentősen csökken. A kofilin^{pSer3} defoszforilációját a Slingshot (SSH) foszfatázok

katalizálják (SSH1L, SSH2L és SSH3L) (Niwa és mtsai., 2002) és (Ohta és mtsai., 2003). A kofilin^{pSer3} foszforilációs szintjének fenntartása tehát hozzájárulhat az aktin fokozott polimerizációjához és ezzel a barrier diszfunkció kialakulásához is. Kimutatták, hogy SSH aktivitása is foszforilációval szabályozható CaMK-II által, foszforilált állapotban inaktív és CN-el történő defoszforilációval aktiválódhat.



2. ábra: Foszforilációs/defoszforilációs folyamatok szerepe a tüdő endotél sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában (Dudek és mtsai., 2001).

Igazolták, hogy a cAMP, valamint a PKC is stimulálja a kofilin defoszforilációját Ca²⁺-független útvonalon keresztül (Meberg és mtsai., 1998), ami arra utal, hogy a CN-on kívül más foszfatázok is részt vehetnek a kofilin^{pSer3} és/vagy SSH defoszforilációjában és aktiválásában (Ambach és mtsai., 2000).

Az endotél MLCK és a MLC20 foszforiláció

A MLC Ser19-es vagy a Ser19 és Thr18-as oldalláncain történő foszforilációt a Ca^{2+} /CaM-függő MLCK katalizálja. Az endotéliumban a MLCK a simaizomban ismert enzimtől nagyobb molekulatömegű (214 kDa), melynek expressziója a humán 3-as kromoszóma génjéről történik. Ugyanezen gén felelős simaizomban a kisebb méretű (130-150 kDa) MLCK expressziójáért is. Az EC MLCK ugyanazon szerkezeti elemeket és doméneket tartalmazza, melyek a simaizom formában is megtalálhatók, kivéve egy EC specifikus 922 aminosavból álló N-terminális domént, melyet számos protein kináz (pl. PKA, PKC, PAK, Src és CaMKII) foszforilál. Az EC MLCK Ser/Thr oldalláncainak foszforilációja a cAMP-függő protein kináz (PKA) vagy p21-aktivált protein kináz (PAK) által csökkenti az enzim katalitikus aktivitását (Goeckeler és mtsai., 2000).

Irodalmi adatok szerint az ERK-1 és -2, valamint MAPK foszforilálják a MLCK-t (Klemke és mtsai., 1997), így szabályozzák a MLC20 foszforilációt is (Mansfield és mtsai., 2000). Továbbá az EC MLCK N-terminális régiójának SH2 doménjei egyéb fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását is lehetővé teszik, például stabil komplex képződését a pp60Src-vel és a kortaktinnal. A MLCK Tyr oldalláncait a pp60Src (SRC) foszforilálja, ami növeli a kináz aktivitását (Garcia és mtsai., 1997)

A MLC20 foszforilációját simaizomban és HeLa sejtekben az integrinhez-kötődő kináz (ILK) és a leucin-cipzárral kölcsönható kináz (ZIPK) is katalizálja a Ser19 és Thr18 oldalláncokon is. Ezen kinázok szerepét azonban a MLC20 foszforilációjában endotél sejtekben eddig nem vizsgálták (Chang és mtsai., 2010 és Borman és mtsai., 2002).

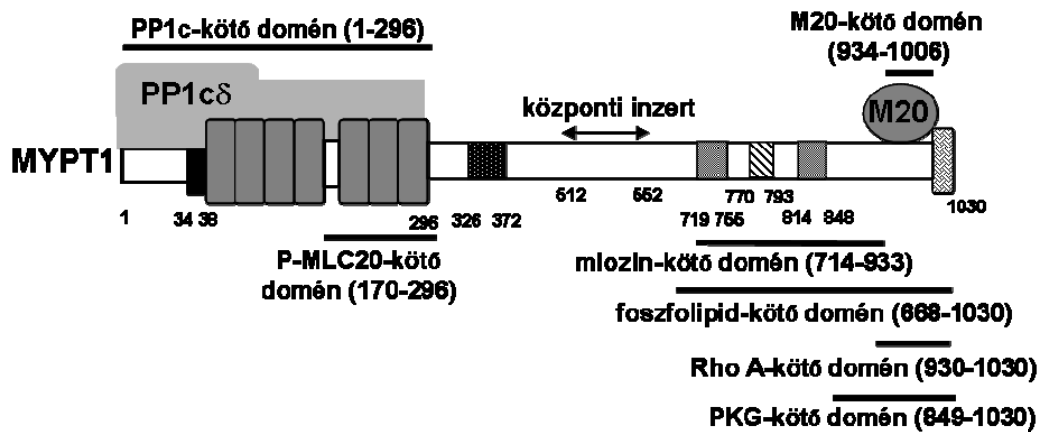
Ezek az adatok arra utalnak, hogy a MLCK-nak elsődleges szerepe van a MLC20 foszforilációjában EC-ben és az EC barrier funkciójának szabályozásában.

Miozin foszfatáz szerkezete és szabályozása

A miozin foszfatáz holoenzim felépítése

A MP holoenzim (MPH) heterotrimer, egy 38 kDa (PP1c δ) protein foszfatáz-1 katalitikus alegységből, egy 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1) és egy 20 kDa alegységből (M20) áll (Alessi és mtsai., 1992; Hartshorne és mtsai., 2004 és Ito és mtsai., 2004). A MP holoenzimben a MYPT1 alegység szabályozza az enzim szubsztrát-specifitását és a PP1 katalitikus alegység (PP1c) aktivitását is. A MYPT1 foszforilációja a Thr696 és Thr853 oldalláncokon gátolja a PP1c aktivitást.

A MYPT1 alegységeket elsőként csirke zúza (Shimizu és mtsai., 1994) könyvtárból klónozták, és kimutatták két különböző, egy hosszabb (133 kDa) és egy rövidebb (110-130 kDa) izoforma létezését. A különböző MYPT1 izoformák ugyanarról a génről íródnak át. A kazetta-típusú RNS-szerkesztési variánsok közötti különbségek a középső inzert (123 nukleotid, 512-552 inzert) illetve a leucin cipzár jelenlétének vagy hiányának tulajdoníthatók. A részletesebben tanulmányozott MYPT1 mellett ismertek más MYPT izoformák is, mint például a MYPT2 (Fujioka és mtsai., 1998) és MYPT-hez hasonló fehérjék, a MBS85 (Tan és mtsai., 2001), a MYPT3 (Skinner és mtsai., 2001) és a TIMAP (Cao és mtsai., 2002).



3. ábra: A humán MYPT1 izoforma szerkezete (Ito és mtsai., 2004).

A MYPT1 N-terminális részén PP1c-kötőmotívum a $^{35}\text{KVVF}^{38}$ (35-38 aminosavak) található. Az ankirinszerű ismétlődéseket a 39-296 tartalmazó szakaszban találjuk, amelynek 170-296 része képes kötődni a foszforilált miozinhoz és a MLC20-al (Hirano és mtsai., 1997). A MYPT1 további szakaszai a 326-372 aminosavak közötti savas oldalláncokban gazdag régió, a 719-755 és a 814-848 aminosavak között található ionos szakaszok, a Ser/Thr-ban gazdag 770-793 aminosavak által bezárt szakasz, valamint a molekula közepén található inzert (512-553), amelynek megléte vagy hiánya az eltérő molekulatömegű (130-133 kDa) izoformákat eredményezi. Két sejtmagi lokalizációs szignál (NLS) közül az egyik az N- (27-33), másik a C-terminális (845-854) részen helyezkedik el. A C-terminális jellemző szakasza a leucin cipzár motívum (1006-1030), amely nem mindegyik izoformában fordul elő (3. ábra). A defoszforilált miozinnal valószínűleg a C-terminális (714-933) peptidszakasz lép kölcsönhatásba (Eto és mtsai., 1997).

A MYPT1 N- és C-terminális régióhoz is kapcsolódhatnak a MP szubsztrát és szabályozó fehérjéi. A PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régióinak

van alapvető szerepe, amelyek közül elsődleges fontosságú a $^{35}\text{KVKF}^{38}$ kötőmotívum. A kötőmotívum kapcsolódása további három MYPT1 régió kötődését indukálja, amelyek stabilizálják a kölcsönhatást. A PP1c-kötőmotívum kötődését a MYPT1¹⁻²² régió kapcsolódása követi, amely elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ illetve a savas régiót tartalmazó MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ kötődését is (Toth és mtsai., 2000b). A foszforilált miozinnal és MLC20-szal való kölcsönhatásban az N-terminális, ankirinszerű ismétlődések is szerepet játszanak (Ichikawa és mtsai., 1996 és Hirano és mtsai., 1997).

A miozin foszfatáz szabályozása

A szabályozás lehetséges mechanizmusai között szerepel a MP holoenzim gátlása vagy aktiválása, melyek közül a MP gátlását szélesebb körben tanulmányozták. A gátlás létrejöhet a MYPT1 foszforilációja, ill. a MPH teljes vagy részleges disszociációja által, és különböző gátló fehérjékkel való kölcsönhatás eredményeként is.

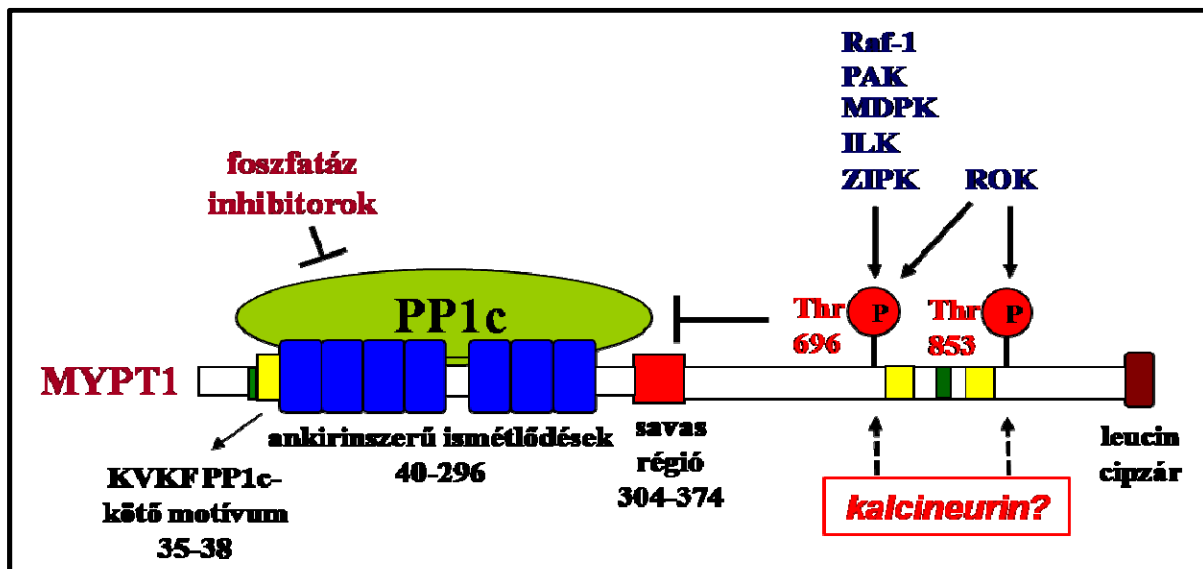
Endotéliumban és simaizomban a MP szabályozása hasonló: a RhoA/ROK (Rho-kináz) jelátviteli útvonalon következik be, amelynek során a ROK a Thr696 és Thr853 oldalláncokon foszforilálja a MYPT1-et a MP foszfatáz aktivitás gátlását okozva (Feng és mtsai., 1999a és Muranyi és mtsai., 2005). Más kinázok, így pl. integrinekhez kapcsolódó kináz (ILK) (Kiss és mtsai., 2002), leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIP kináz) (Niuro és mtsai., 2001), PAK (Takizawa és mtsai., 2002b), izom disztrófia protein kináz (MDPK) (Muranyi és mtsai., 2001) valamint a Raf-1 kináz (Broustas és mtsai., 2002) is képesek a MYPT1 gátló foszforilációs helyét foszforilálni (4. ábra). A MYPT1-Thr853 oldallánc foszforilációja a MYPT1 és miozin közötti kölcsönhatás gyengítése révén befolyásolja a szubsztrát kötődését is (Velasco és mtsai., 2002).

A PKC a PP1c-kötőmotívum mellett található Thr34 oldalláncot foszforilálja, de a foszfátcsoport beépülése nincs hatással a holoenzim aktivitására, valamint a PP1c és a MYPT1 kölcsönhatására. A PKC a MYPT1-et az ankirinszerű ismétlődő régióban is foszforilálja és ez a módosítás csökkenti a MYPT1 miozinhoz és PP1c-hez való kötődését (Toth és mtsai., 2000a).

A gátló hatások mellett az enzim aktiválását is eredményezheti a MYPT1 foszforilációja. Ciklikus nukleotid-függő kinázok és az általuk aktivált kinázok, pl. a protein kináz A (PKA) vagy a protein kináz G (PKG) a MYPT1 C-terminális szakaszát (Ser691, Ser695 és Ser852 oldalláncait) foszforilálják (Wooldridge és mtsai., 2004). A Ser695 a Thr696 gátló foszforilációs hely mellett található. Foszforilációja nincs közvetlen hatással a

holoenzim aktivitására (Nakamura és mtsai., 1999), de megakadályozza a MYPT1 Thr696 oldalláncának ROK által történő foszforilációját, kivédve így a MP gátlását.

Fontos megemlítenünk a CPI-17-t, amely valamennyi PP1 holoenzim közül szelektíven gátolja a miozin foszfatáz enzimkomplexet (Eto és mtsai., 2004).



4.ábra: A MYPT1 regulátor alegység szabályozása a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációjával

A CPI-17 általi MP gátlás előfeltétele a CPI-17 foszforilációja a Thr38 oldalláncon PKC (Eto és mtsai, 1997), ROK (Koyama és mtsai., 2000), ZIPK (MacDonald és mtsai., 2001) vagy ILK (Eto, 2009) által, amely ezerszeresére növelheti foszfatázgátló képességét. A foszforilált inhibitor a PP1 aktív helyéhez kötődik, és stabil inaktív komplexet alakít ki a MYPT1-gyel asszociált katalitikus alegységgel. A foszfo-CPI-17 más regulátor alegységet tartalmazó holoenzimekhez is kapcsolódhat, ahol azonban defoszforilálódik és disszociál a komplexből. A miozin foszfatázhoz való kötődésében a CPI-17 középső doménja játszik szerepet, a miozin foszfatáz defoszforiláló hatásától az itt található Tyr41 oldallánc védi meg (Deng és mtsai., 2002). A gyulladást kiváltó ágensek (hisztamin, trombin) gyors MLC foszforilációt váltanak ki, ezáltal növelik az endotél sejtek permeabilitását. A CPI-17 minden EC típusban expresszálódik és elősegíti a trombin/hisztamin-indukált stressz-kábel képződést és a barrier diszfunkció kialakulását (Kolosova és mtsai., 2004). Az eddig közölt adatok alapján úgy tűnik, hogy az EC-ben a Thr696 oldallánc foszforilációs szintje tükrözi a MP aktivitását és ez összefügg a MLC20 foszforilációs szintjének mértékével, valamint az EC

permeabilitásának változásaival (Birukova és mtsai., 2004 és van Nieuw Amerongen és mtsai., 2008).

A PP2A és a CN defoszforilálja a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} oldalláncokat *in vitro* (Takizawa és mtsai., 2002b). HepG2 (Lontay és mtsai., 2005) és THP-1 (Kiss és mtsai., 2008) sejtekben kimutatták, hogy a PP2A gátlása foszfatáz gátló toxinokkal (OA vagy CLA) növeli a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} szintet, ami a PP2A szerepére utal a MYPT1 defoszforilációjában ezekben a sejtekben. Kevés ismeretünk van azonban a foszforilált MYPT1 defoszforilációjára vonatkozóan EC-ben.

A kalcineurin szerkezete és szabályozása

A kalcineurin szerkezete

Az 1980-as években folytatott biokémiai tanulmányok a CN sokoldalú szerepére, az eukarióta sejtek jelátviteli folyamataiban nélkülözhetetlen mivoltára hívták fel a figyelmet (Cohen, 1989 és Klee és mtsai., 1998).

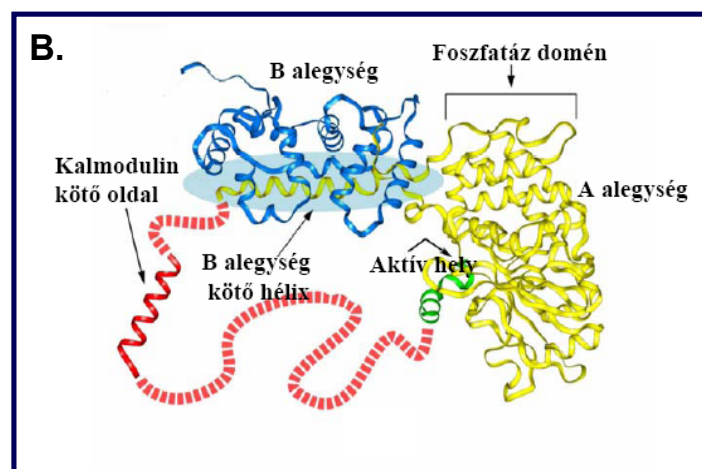
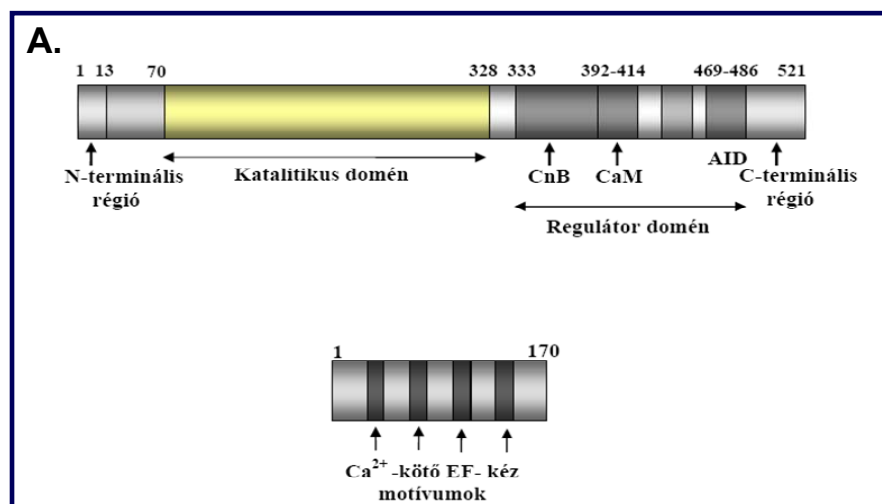
A CN a katalitikus domént tartalmazó 58-61 kDa molekulatömegű CNA alegységből és egy 16-19 kDa méretű Ca²⁺-kötő regulátor B alegységből (CNB) áll. Ez a heterodimer az aktív centrumban Fe²⁺-Zn²⁺ ionokat tartalmaz és Ca²⁺/CaM kötődését követően mutat foszfatáz aktivitást (Rusnak és mtsai., 2000).

Az emlős CNA-nak három izoformája (α , β és γ) ismert, amelyek alternatív hasítás („splicing”) eredményeként létrejövő három különböző gén termékei. A CNA α elsősorban az agyban, a CNA β főleg a tímuszban, míg a γ izoforma túlnyomó részt a herében található (Guerini és mtsai., 1989 és Muramatsu és mtsai., 1992). A CNB elsődleges szerkezete nagymértékben konzervált. A CNB gén 170 aminosavból álló fehérjét kódol, ami négy Ca²⁺-kötő EF-kéz motívumot foglal magában, amelyek közül egy nagy affinitású (Kakalis és mtsai., 1995). Az emlősökben két CNB gén található, így a CNB regulátor alegységnek két emlős eredetű izoformája létezik: a CNB1, melynek előfordulása széleskörű (az agyban) és a testis specifikus izoforma, a CNB2 (Ueki és mtsai., 1992 és Chang és mtsai., 1994) (5. ábra, A).

A CN aktív helye az CNA alegységben található. Az A alegység C-terminális végén helyezkedik el a CNB-kötő domén, a CaM-kötő domén és az autoinhibitor domén (AID). Az autoinhibitor domén Ca²⁺/CaM hiányában α -hélixet képezve a katalitikus domén szubsztrát-kötő helyéhez kapcsolódik oly módon, hogy a glutamát oldalláncok hidrogén-kötéseket

hoznak létre a fémionokhoz koordinált vízmolekulákkal (Kissinger és mtsai., 1995), és ezzel gátolja a foszfatáz aktivitást (5. ábra, B). Az enzim aktivitása függ a Ca^{2+} -ion CNB regulátor alegységhez, ill. a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ CNA katalitikus alegységhez való kötődésétől (Jin és mtsai., 2012). A CN aktiválásához ekvivalens mennyiségű CaM és négy ekvivalens Ca^{2+} -ion, a kalmodulin aktiválásához pedig legalább két Ca^{2+} -kötőhely telítése szükséges. Amikor a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a CNA CaM-kötő doménjéhez (Lys-392-Arg-414) kötődik, az autoinhibitor domén által okozott gátlás megszűnik, ami feltehetően azzal magyarázható, hogy a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kötődését követő konformáció változás az aktív hely szabaddá válását teszi lehetővé (Rumi-Masante és mtsai., 2012).

A CN feltételezett katalitikus mechanizmusának első lépése a foszfátészter-szubsztrát asszociációja az enzimmal. Ebben a lépésben a negatív töltések semlegesítődnek, feltehetőleg az aktív centrumban található fémionok által.



5. ábra: A: A kalcineurin (CN) katalitikus és regulátor alegységének doménszerkezete, B: A CN heterodimer térszerkezete (Aramburu és mtsai., 2000).

Fontos szerepet játszanak ebben a lépésben az aktív helyen található, konzervált Arg122, Arg254, valamint a His151 oldalláncok, amelyek a szubsztrát-kötésben és a töltések semlegesítésében, valamint az átmeneti állapot stabilizálásában vesznek részt. Az átmeneti állapot átrendeződése után egy ortofoszfát molekula a két fémionhoz kapcsolódik, ahonnan valószínűleg egy oldószer molekula közreműködésével hasad ki, és a CN visszanyeri eredeti állapotát (Rusnak és mtsai, 2000).

A kalcineurin szabályozása

A CN aktivitását elsősorban az $[Ca^{2+}]_i$ szabályozza. Nyugvó sejtekben, ahol alacsony az $[Ca^{2+}]_i$, a CN-hoz kalmodulin nem kötődik, az enzim inaktív formában van jelen. Amikor a sejtet olyan inger éri, amely hatására az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedik, a Ca^{2+} a CaM-hoz kapcsolódva konformáció változást idéz elő, ami lehetővé teszi a Ca^{2+} /CaM komplex CNA-hoz való kötődését, indukálva ezzel a foszfatáz aktivitást (Musson és mtsai., 2011).

A CN aktivitását az aktív helyen található fémionok (Fe^{2+} , Zn^{2+}) redox reakciói is szabályozzák. A CN redox szabályozását *in vitro* tanulmányozták, de ilyen folyamatok *in vivo* körülmények között is lejátszódhatnak. Biokémiai és spektroszkópiai tanulmányok kimutatták, hogy az enzimnek csak Fe^{3+} és Zn^{2+} oxidációs állapotú ionokat tartalmazó formái aktívak, így a Fe^{3+} redukciója az enzim gátlását eredményezi (Bogumil és mtsai., 2000). Wang és mtsai ezzel ellentétes hipotézist állítottak fel, ugyanis azt feltételezték, hogy az aktív centrumban lévő Fe^{2+} - Zn^{2+} oxidációja Fe^{3+} - Zn^{2+} ionokká okozza az enzim gátlását (Wang és mtsai., 1996). Kimutatták, hogy a szuperoxid diszmutáz megvédi a CN-t az inaktiválástól, feltételezésük szerint oly módon, hogy az enzim megakadályozza az aktív helyen lévő fémionok oxidációját. Ezzel összhangban, az utóbbi időben számos csoport vizsgálta ezt a hipotézist, és szolgáltatott bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy teljes sejtizátumban az extracelluláris oxidánsok, különösképpen a H_2O_2 , hatással lehetnek a kalcineurin aktivitására. Így számos sejttypusban (NK sejtek, T limfociták, fibroblasztok, neuroblasztoma sejtek) a CN aktivitás csökkenését a reaktív oxigén gyökök (ROS) koncentrációjának az emelkedésével hozták összefüggésbe (Wang és mtsai, 1996). A sejtek mikromoláris koncentrációjú H_2O_2 -dal történő kezelését követően az NFAT és az NF κ B mediálta folyamatok gátlását figyelték meg, ami feltehetőleg a kalcineurin aktivitás csökkenésének a következménye. Ezt pedig az aktív centrumban lévő Fe^{2+} oxidációjával magyarázták, olyan CN formát feltételezve, amelyben Fe^{3+} - Fe^{2+} centrum van és a Fe^{2+} oxidálása eredményez inaktiválást (Rusnak és mtsai, 2000).

A CN harmadik szabályozási lehetősége az enzim foszforilációja. A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -függő protein kináz II (CaMK-II) autofoszforilált és kalciummentes formája képes a CNA alegységét foszforilálni. A $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kötődése CN-hoz gátolja ezt a foszforilációt. A CN CaMK-II általi foszforilációja csökkenti a foszfatáz aktivitását (Rusnak és mtsai, 2000). A PKC is képes a CN-t foszforilálni, ami nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását, azonban a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ komplex kötődése a CN-hoz gátolja ezt a foszforilációt is (Hashimoto és mtsai., 1989).

A calcineurin inhibitorai

A CsA és az FK506 molekulákat immunszuppresszánsként a klinikai gyakorlatban szervátültetések során alkalmazták, valamint a bőrgyógyászatban is használják (Taylor, 2005). A CsA immunszuppresszív tulajdonságait 1976-ban állatmodelleken fedezték fel (Borel és mtsai., 1976). Később kezdték használni a klinikai gyakorlatban, majd 1987-ben a CsA-val megegyező hatású vegyületként felfedezték az FK506-ot (Goto és mtsai., 1987).

Ezek a vegyületek olyan intracelluláris receptor fehérjékhez (immunofilinok) kötődve fejtik ki hatásukat, amelyek peptidil-prolil izomeráz (PPIáz) és/vagy chaperon aktivitással rendelkeznek a sejtben. A CsA a ciklofilin A-hoz (CypA), az FK506 az FK506-kötő fehérjéhez (FKBP12) kapcsolódva fejt ki CN gátló hatását (Liu és mtsai., 1991; Kissinger és mtsai, 1995 és Ke és mtsai., 2003). A CN defoszforilálja az NFAT Ser13 oldalláncát és ezzel elősegíti a citoplazmából a sejtmagba történő transzlokációját, ahol az NFAT a DNS-hez kötődik és fokozza az interleukin-2 (IL-2) expressziójáért felelős gén átírását, amely a T-limfociták aktivációjáért és az immunválaszért felelős. A CN gátlószerek immunszuppresszív hatásának alapja, hogy gátolják az NFAT defoszforilációját és ezzel a fehérje sejtmagba történő transzlokációját, ami csökkent IL-2 expressziót és immunválaszt eredményez. A CN szubsztrátjaiban (pl. NFAT) azonosították a PxIxIT és LxVP szekvencia-motívumok (CNBR1 és CNBR2/calcineurin binding region) (Liu és mtsai., 1999) sok esetben felelősek a CN-szubsztrát kapcsolat kialakulásáért.

A Cabin-1 a CN inhibitor fehérjéi közé tartozik. Szinte minden sejt típusban kifejeződik, és a sejten belül a citoplazmában, ill. a sejtmagban egyaránt megtalálható. T-sejtekben kalcium jelre a sejtmagból a citoplazmába transzlokálódik. A CN-kötő domént kevesebb, mint 40 aminosav alkotja. Ezen belül található konzervált PxIxIT CN-kötő szekvencia variáns, a PEITVT motívum. T-sejtekben a Cabin-1 és a CN közötti kölcsönhatáshoz kalcium jel és PKC aktiválás egyaránt szükséges. A Cabin-1 foszfoprotein,

nem aktivált T-sejtekben foszforiláltsági szintje alacsony, PKC aktiválás hatására hiperfoszforilált lesz, ami fokozza affinitását a CN-hoz. A Cabin-1 gátolja a CN aktivitását, ami az NFAT fenntartott foszforilációs állapotát és csökkent IL-2 produkciót eredményez (Lai és mtsai., 1998 és Liu, 2003).

A kalcineurin szerepe a barrier funkció szabályozásában

Verin és munkatársai kimutatták, hogy a CN-nak fontos szerepe van a marha és humán tüdő artéria EC citoszkeleton szerkezetének szabályozásában (Verin és mtsai, 1998). Bizonyították, hogy a CN mindhárom katalitikus alegység izoformája (CNA α , CNA β és CNA γ) expresszálódik humán endotél sejtekben közel azonos mennyiségben, és kimutatták, hogy trombin kezelés hatására ezek aktivitása fokozódik, amely egyben a katalitikus alegység foszforilációjával jár együtt. További megfigyelések is alátámasztják a CN barrier funkcióban betöltött szerepét, például gátlása csökkenti a trombin kezelés következtében foszforilálódott citoszkeletonális fehérjék defoszforilációját (Bogatcheva és mtsai., 2002).

Újabb eredmények szerint a CN gátlása elősegíti a trombin-indukált PKC α aktivitás növekedést tüdő mikrovaskuláris endotél sejtekben. Azt is kimutatták, hogy a CN gátlása meghosszabítja a trombin-indukált endotél diszfunkciót, azonban PMA kezelés hatására bekövetkező PKC degradáció kivédi ezt a hatást, jelezve, hogy a CN fontos szerepet játszik a barrier funkció szabályozásában, a diszfunkció megszüntetésében (Lum és mtsai., 2001).

Kimutatták, hogy a PKA gátlása növelte az aktin kolokalizációját a CN-nal és a MLCK-val, amely összefüggésben áll a sejt-sejt közötti kapcsolatok átrendeződésével. Ennek során növekvő F-aktin és stressz-kábel képződést figyeltek meg, melyek a CN, a MLCK és a PKA enzimek működése közötti kapcsolatra utalnak (Patterson és mtsai., 2000).

CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintés is tükrözi, hogy endotél modell rendszerben, a MLC20 foszforiláció, ill. az aktin polimerizáció szabályozása széleskörűen tanulmányozott terület, elsősorban azért, 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. Mindezek ellenére az aktin polimerizációt és a miozin foszforilációt szabályozó tényezők nem minden részletükben feltártak. Irodalmi adatok alapján a kalcineurin (CN/PP2B) befolyásolja az endotél barrier funkciót és a citoszkeltális fehérjék foszforilációját, azonban az enzim e funkciójának molekuláris mechanizmusa még nem ismert. Felvetődik annak a lehetősége, és ezt irodalmi adatok is sugallják, hogy a kalcineurin az aktin polimerizációt és a miozin foszforilációt szabályozó enzimek foszforiláltsági szintjét befolyásolhatja.

Mindezek alapján kutatási célkitűzéseink az alábbi kérdések tanulmányozásához kapcsolódtak:

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

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Vegyszerek

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásból: [γ - 32 P]ATP (Izotóp Intézet Kft, Budapest); Glutation Sepharose, nitrocellulóz membrán (0,45 μ m pórusméret) (GE Healthcare); trombin, CsA, FK506, marha szérum albumin (BSA), EZview™ Red ANTI-FLAG M2 affinitás Gél (Sigma); H1152 (Shichem); teljes mini proteáz inhibitor koktél tabletták (Roche); nagy érzékenységű kemilumineszcenciás (ECL) reagens (Pierce); ProLong Gold Antifade médium DAPI-val, Fura-2 fluoreszcens Ca^{2+} -szenzitív festék (Molecular Probes); antibiotikum-antimikotikum oldat, magzati borjú szérum (FBS), MEM (minimum esszenciális tápoldat), DMEM (Dulbecco minimális esszenciális tápoldat), L-glutamin, MEM nem-esszenciális aminosavak, Na-piruvát, tripszin/EDTA (Gibco); EBM-2 (endotél sejt alap médium-2) tápoldat és EBM-2 SingleQuot növekedési faktorok, tripszin neutralizáló oldat, tripszin/EDTA és HEPES puffer (Clonetics); jetPEI transzfekciós reagens (Polyplus); Dulbecco foszfát puffer (DPBS) és foszfát puffer (PBS) (Life Technologies); Kaleidoscope fehérje molekulatömeg standard (Bio-Rad); CM5 szenzor chip, Amin Kapcsolási Kit, GST Kapcsolási Kit, N-hidroxi-szukcinimid (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbiimid (EDC) (Biacore). Minden más vegyszer a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb tisztaságú volt.

Antitestek, fehérjék

Az antitesteket a feltüntetett irodalmi hivatkozásokban leírtak szerint alkalmaztuk, vagy kereskedelmi forgalomból szereztük be és a gyártók útmutatásai szerint használtuk: anti-MYPT1^{pThr696}, anti-MYPT1^{pThr853}, anti-PP1c δ , anti-tubulin és anti-GFP (Upstate); anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (Lontay és mtsai., 2004); monoklonális anti-MYPT1 (Muranyi és mtsai., 1998); anti-MLC20, anti-MLC20^{pSer19} és anti-kofilin^{pSer3} (Cell Signaling), anti-CNA α , tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl IgG, HRP konjugált anti-egér IgG (Sigma); Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG, Alexa 546-konjugált anti-egér IgG és Texas Red-falloidin (Molecular Probes).

Fehérjék: a csirke zúza 133 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (teljes hosszúságú) és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (C-terminális fragment) fehérjéket (Feng és mtsai., 1999b) és a csirke zúza 130 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő, His-MYPT1¹⁻⁶³³, His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ (N-terminális fragmentek) fehérjéket (Hirano és mtsai, 1997) *Escherichia coli* sejtekben expresszáltuk és tisztítottuk, PP1c és PP2Ac (Kiss és

mtsai.) és inhibitor-2 (Cohen és mtsai., 1988) fehérjéket nyúl vázizomból preparáltuk, a CN-t marha agyból tisztítottuk (Tallant és mtsai., 1983) a hivatkozásokban megadott módszerek szerint.

Oligonukleotid primerek

A különböző CNA izoformák teljes kódoló szekvenciáit PCR-ral sokszorosítottuk, majd pEGFP-C1 vektorba (Clontech) szubklónoztuk. A Δ CnA α rövidített izoformát a pcDL-R α 296-ből (O'Keefe és mtsai., 1992) szubklónoztuk pEGFP-C1 vektorba. A felerősítéshez használt specifikus primerek a restrikciós hasítóhelyekkel a következők voltak:

CnA α : Hind III 5'-GCTCAAGCTTCTATGTCCGAGCC-3' és

BamH I 5'-CCGGCGGATCCTCACTGAATATT-3';

CnA β : Sal I 5'-CTACAGTCGACATGGCCGCCCCGGAG-3' és

BamH I 5'-GCACGGGATCCTCACTGGGCAGTATGG-3';

CnA γ : Sal I 5'-CTGCAGTCGACATGTCCGGGAGG-3' és

BamH I 5'-GCCCCGGGATCCTCATGAATGGGC-3'.

Mindegyik konstruktot, ill. azok olvasási kereteit szekvenálással ellenőriztük vektor és inzert specifikus primerekkel.

A Flag-MYPT1 expressziós plazmidot a GeneCopoeia-tól szereztük be, amelyben a MYPT1 kódoló szekvenciáját pReceiver-M11 vektorba szubklónozták, az alábbi specifikus primerek segítségével: 5'-CAGCCTCCGGACTCTAGC-3' és

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'.

Módszerek

Plazmid preparálás

A kívánt DNS szakaszt tartalmazó plazmidot hordozó telepeket először 100 μ g/ml kanamicint tartalmazó 5 ml LB (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1,5 % agar, pH 7,0) folyékony táptalajba oltottuk le, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk 180 rpm fordulatszámú rázatás mellett. A plazmidpreparálást a QIAprep Spin Miniprep vagy Maxiprep plazmid izoláló, valamint a Novagien (MobiusTM 1000 Plazmid Kit) kitek segítségével izoláltuk a cég által leírt használati utasítás alapján. A beépült DNS méretét a plazmid megfelelő restrikciós enzimmel történő emésztését követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os gélen.

Sejtkultúrák

Kísérleteinkben marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC, Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells); humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC, Human Pulmonary Artery Endothelial Cells) (Clonetics) és tsA201 (humán embrionális vesesejt) sejteket használtunk. A tsA201 sejteket a Health Protection Agency Culture Collection-tól rendeltük és a gyártó által ajánlottak szerint tenyésztettük.

Sejtek tenyésztése

Az BPAEC sejtek tenyésztése MEM médiumban történt, mely 20 % borjú szérumot (FBS), 500 U/ml antibiotikum-antimikotikumot, 2mM Na-piruvátot és 0,1 mM MEM nem-esszenciális aminosavakat tartalmazott. T75-ös flaskában, a 100 %-os konfluencia elérésekor a sejteket passzáltuk: a médiumot eltávolítottuk, majd a sejteket 3x mostuk 10 ml PBS-sel (20 mM Na₂HPO₄, 115mM NaCl, pH 7,4). Ezután a sejtekhez 2 ml tripszint (0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA) adtunk és 2-3 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd leválasztottuk a sejteket az edény faláról. 8 ml komplett médium hozzáadása után a sejtszuszpenziót kettéosztottuk és 2 db 50 ml Falcon csőbe. Az esetenként az edény falán maradt sejteket 50 ml médiummal mostuk le és azt a sejtszuszpenzióhoz adtuk. Ezt követően 15-15 ml sejtszuszpenziót 4 db 75 cm² tenyésztő edénybe tettünk és a sejteket CO₂ termosztátban (5 % CO₂ és 95 % levegő) 37 °C-on tenyésztettük. A BPAEC sejteket a 8. passzálsási fázisban kaptuk és 17-22 passzálsásig használtuk az irodalomban korábban leírtaknak megfelelően (Stasek és mtsai., 1992).

A HPAEC sejtvonalat EBM-2 médiumban tenyésztettük 10 % FBS és EGM-2 SingleQuots növekedési faktorok jelenlétében T25-ös flaskában. A 100 %-os konfluencia elérésekor a sejteket passzáltuk: a médiumot eltávolítottuk, majd a sejteket 3x mostuk 4 ml HEPES pufferrel. Ezután a sejtekhez 2 ml tripszint (0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA) adtunk és 5 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd ütögetés segítségével leválasztottuk a sejteket az edény faláról. Tripszin neutralizáló oldat (4 ml) hozzáadása után a sejtszuszpenziót centrifugáltuk (2500 rpm, 7 min, 4 °C-on), 3 ml komplett médiumba felszuszpendáltuk, majd 1 ml-enként 3db T25-ös flaskába osztottuk szét, amelyekben a sejtszuszpenzió végtérfogatát 5 ml-re egészítettünk ki komplett médiummal. Az edény falán maradt sejteket 1 ml médiummal mostuk, amit a sejtszuszpenzióhoz adtunk. A sejtek tenyésztése a BPAEC-hez hasonló körülmények között történt. A HPAEC sejteket a 4-7 passzálsásig használtuk.

A tsA201 sejteket (Health Protection Agency Culture Collection) DMEM médiumban tenyésztettük, mely 10 % FBS, 2 mM L-glutamint, és 500U/ml antibiotikum-antimikotikumot tartalmazott. A sejteket T75-ös flaskában, 100 %-os konfluencia eléréséig 5 % CO₂ és 95 %

levegő jelenlétében 37 °C-on tenyésztettük, majd az előzőekben leírtak szerint a BPAEC sejtekhez hasonlóan passzáltuk.

BPAEC és HPAEC sejtek kezelése effektorokkal

Az effektorokkal való kezelésekhöz az EC-t 100 % konfluenciáig növesztettük 100-mm-es sejtenyésző edényekben vagy steril fedőlemezekben, majd a sejteket szérum-mentes médiumban 2 µM CsA (30 perc, 4 óra) vagy 0,1 µM FK506 (4 óra) vagy 50 nM trombin (1, 2, 10, 30 perc) jelenlétében inkubáltuk, vagy kombinált kezeléseket esetén a sejteket 2 µM CsA-val 30 percig előinkubáltuk a trombin kezeléseket megelőzően. Egyes kísérletekben a sejteket 10 µM H1152-vel (ROK inhibitor) 30 percig kezeltük és ezt követően alkalmaztunk 2 µM CsA (30 perc) vagy 2 µM FK506 (30 perc) kezeléseket. A kezeléseket követően a sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, felkapartuk és centrifugálással összegyűjtöttük.

Transzfekció

A tsA201 és BPAEC sejteket 70 %-os konfluencia eléréséig szövettényésző edényekben növesztettük, majd transzfektáltuk a pEGFP, CNA alegység és a Flag-MYPT1, ill. ko-transzfektáltuk a pEGFP és ΔCNA-pEGFP, vagy Flag-MYPT1 és a CNAα-pEGFP expressziós plazmidokkal.

A BPAEC sejteket a Fugene HD transzfekciós reagenssel, míg tsA201 sejteket a jetPEI transzfekciós reagenssel transzfektáltunk, követve a termékekre vonatkozó instrukciókat. Transzfekció után a sejteket 24 és 48 óráig inkubáltuk, majd 3x mostuk PBS-el mielőtt további kísérletekhez használtuk fel.

Western blot

A BPAEC, HPAEC és tsA201 sejtekből nyert fehérjéket SDS-PAGE módszerrel választottuk el Laemmli (Laemmli, 1970) módszerét alkalmazva 10-20 % akrilamidot tartalmazó gélen Bio-Rad MiniProtean készüléket használva. A géleken elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra elektroblotoltuk BioRad transfer egységgel (100 V, 90 perc) BioRad hűtőegység alkalmazásával. A membrán blokkolásához 5 % zsírszegény tejport és 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-t (PBST) használtunk. Az elsődleges (primer) és másodlagos (szekunder) antitesteket PBST-ben hígítottuk. A blokkolást követően a membránokat mostuk, majd primer antitesttel 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt HRP-konjugált másodlagos antitesttel történő inkubálás követte szobahőmérsékleten, 2 órán át. A foszforilációs helyre specifikus antitestek esetén a PBS/PBST puffer helyett minden esetben TBS/TBST puffert (25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5/0,05 % Tween 20) használtunk.

Az immunreakciókat nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló reagenssel (ECL) detektáltuk a FlourChem FC2 géldokumentációs rendszerrel. A blotokat denzitometráltuk, a blotok intenzitását ugyanazon gélen futtatott (pl. tubulin, MYPT1) belső kontrollra normalizáltuk, a különböző kezelések esetén a denzitometriás értékeket a sorozatok kontroll mintáira vonatkoztattuk.

Pull-down kísérletek

A tsA201 sejteket 70 %-os konfluencia eléréséig szövettenyésztő edényekben növesztettük fel, majd transzfekciót követően (Flag-MYPT1 vagy Flag-MYPT1 és CNA α -pEGFP plazmidokkal) 24-48 órás posztranszfekciós idő elteltével a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, PBS-ben felkapartuk és centrifugálással (10 min, 4 °C-on, 1500 x g) összegyűjtöttük. A sejteket 1 ml lízis pufferben (10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél) lizáltuk. Az anti-Flag gyantát (50 μ l) 500 μ l TBS-ben ekvibráltuk és ezt követően a sejtízátummal inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, folyamatos kevertetés mellett. A gyantát háromszor mostuk TBS-vel, majd centrifugáltuk (8200 x g, 4 °C, 30 sec). A gyanta által 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 lizátumokból 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. A MYPT1-hez részben még e mosást követően is kötődő PP1c-t 0,2 mg/ml His-MYPT1¹⁻²⁹⁶-el való mosással távolítottuk el. Az így nyert Flag-MYPT1 gyantát BPAEC és HPAEC lizátumokkal inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on „kötő” pufferben (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100 és 0,5 % proteáz inhibitor koktél). A precipitált fehérjéket Western blot analízissel, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-CNA α és anti-PP1c δ antitestek segítségével azonosítottuk.

A GST-MYPT1 pull-down kísérleteket BPAEC lizátumokkal végeztük. A BPAEC-et 100-mm sejtenyésztő edényben növesztettük 100 % konfluencia eléréséig, majd 2x jéghideg PBS-sel mostuk és felkapartuk. A sejtfeltárást 1 ml „kötő” pufferben végeztük. A Glutathion-Sepharose gyantát kötő pufferrel ekvibráltuk, majd 400 μ l térfogatú 1 μ M GST-t vagy GST-MYPT1-et tartalmazó oldatot használtunk a fehérjék 100 μ l-100 μ l Glutathion-Sepharose-hoz történő kapcsolásához „kötő” pufferben. A Glutathion-Sepharose által nem kötött GST-t vagy GST-MYPT1-et a „kötő” pufferrel történő mosásokkal (2x) távolítottuk el. A BPAEC

sejtlizátumot (30 µg fehérje) kapcsolatlan Glutation-Sepharose gyantával előtisztítottuk, majd 100 µl GST-vel (kontroll) vagy GST-MYPT1-gyel kapcsolt Glutation- Sepharose-zal inkubáltuk 1 ml-es végtérfogatban 4 óráig 4 °C-on (lassú kevertetéssel). A gyantát háromszor mostuk a kötő pufferrel, majd a gyanta által kötött fehérjéket SDS-mintapufferrel történő forralással szolubilizáltuk és a kötődő CN-t anti-CNA α antitesttel, Western blot analízissel detektáltuk.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A foszfatáz aktivitás meghatározását tisztított PP1c-vel, PP2Ac-vel és CN-al végeztük 32 P-GST-MYPT1-et (0,5 µM) használva szubsztrátként. A GST-MYPT1 (2 µM) fehérjét ROK-al (0,4 U/ml) foszforiláltuk 0,2 mM [γ - 32 P] ATP (5000 cpm/pmol) és 1 mM MgCl₂ jelenlétében 120 percig (Wooldridge és mtsai., 2004). A GST-MYPT1-be beépülő 32 P-foszfat mértéke 1,6 mol 32 P_i/mol MYPT1 volt. A CN aktivitás meghatározása során a reakcióközeg a szubsztrát hozzáadása előtt az alábbi komponenseket tartalmazta: CN (18-72 nM), 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), 40 µg/ml kalmodulin, 0,2 mM CaCl₂, 100 nM OA és 2 nM protein foszfatáz inhibitor-2. A reakciót a 0,5 µM 32 P-jelölt MYPT1 (1-2x10⁴ cpm/reakcióközeg) szubsztrát hozzáadásával indítottuk. A közeget (120 µl) 30 °C-on inkubáltuk és 3, 6, 12 és 20 perc eltelte után 25 µl mintát vettünk, amelyekben a reakciót 100 µl 20 % triklór-ecetsav (TCA) és 100 µl 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kiasapított 32 P_i-ot a kicsapódó fehérjék centrifugálással (8000 x g, 3 min) történő elválasztása után, 180 µl felülúszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A 32 P-GST-MYPT1 defoszforilációját tisztított PP1c (16 nM) vagy PP2Ac (16 nM) enzimekkel is mértük korábban leírt körülmények mellett (Kiss és mtsai).

Intracelluláris Ca²⁺ mérés

BPAEC-eket steril üveg fedőlemezeken 100 %-os konfluenciáig növesztettük 24 óra alatt. A sejteket 5 µM Fura-2 fluorescens Ca²⁺-szenzitív festékekkel inkubáltuk DPBS-ben 60 percig szobahőmérsékleten, majd 3x mostuk DPBS-sel. A méréseket DPBS-ben (9,01 mM CaCl₂, 4,93 mM MgCl₂x6H₂O, 26,67 mM KCl, 14,71 mM KH₂PO₄, 1379,31 mM NaCl, 80,6 mM Na₂HPO₄x 7H₂O) (Ca²⁺ jelenlétében vagy távollétében, ez utóbbi esetben 10 mM EGTA egyidejű alkalmazásával) szobahőmérsékleten végeztük. A sejtek fluoreszcenciáját a Ca²⁺-imaging rendszerrel (InCyt Im2) mértük. A sejteket váltakozva 340 és 380 nm-en világítottuk meg és az 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú emittált fényt mértük. A sejteket 2 µM CsA-val 30 percig kezeltük. Mintánként 23-26 EC-t választottunk ki és az egyes

fluoreszcencia intenzitásokat rögzítettük. Az adatokat az InCyt 4.5 szoftver segítségével elemeztük és az eredményeink kiértékelését Excel, valamint GraphPad Prism 5.0 szoftver segítségével végeztük el.

Transzendentél elektromos ellenállás (TER)

A sejtek barrier funkcióját nagy érzékenyséű biofizikai módszerrel, a transzendentéliális ellenállás (TER) mérésével (electrical cell-substrate impedance sensing system, ECIS, Applied Biophysics, Troy, NY, USA) az irodalomban korábban leírtak szerint végeztük (Schaphorst és mtsai, 1997). A sejteket steril, arany elektróddal (8W10E) ellátott szövettenyésztő edényekben tenyésztettük 100 %-os konfluencia eléréséig, és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk. A mérések a különböző kezeléseket követően, szérumentes médiumban történtek. Az elektromos ellenállást a teljes monolayer-en mértük a kitapadó sejtek felszíne és az arany elektródok közötti ellenállás meghatározásával. Amikor a sejtek kitapadnak, az elektromos ellenállás megnövekszik, azonban ha a sejtek lekerekednek (elváltnak a felszíntől), vagy ha adhéziós készségük csökken, ill. kontraktilitásuk növekszik, akkor a TER csökken. A rezisztencia változásokat 3 órán keresztül folyamatosan rögzítettük, majd a kiértékelések során a rezisztencia értékeket minden minta esetében a saját kiindulási alapvonalra normalizáltuk (Garcia és mtsai, 1997).

Felületi plazmon rezonancia

A CN és MYPT1 között kialakuló kölcsönhatást felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel vizsgáltuk Biacore 3000 készülékkel. A karboxi-metil dextrans típusú CM5 szenzor chip felületére anti-GST antitestet kötöttünk a fehérje amino-csoportjainak kapcsolásával. A felület előkészítése és a mérések kivitelezése során egyaránt 10 µl/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. A chip felületét 200 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbiimid és 50 mM N-hidroxi-szukeinimid összetételű oldat injektálásával aktiváltuk. Az aktivált felületre 30 µg/ml anti-GST antitestet injektáltunk 10 mM Na-acetát (pH 5,0) pufferben 7 percig. A megmaradó reaktív csoportokat ezután 70 µl 1 M etanol-amin (pH 8,5) injektálásával blokkoltuk. A következő lépés a fehérjék immobilizálása volt. A GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (teljes hosszúságú) és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (C-terminális fragmentum) fehérjéket 25 mM Tris-Cl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT és 1,5 mM CaCl₂ összetételű pufferben immobilizáltuk az anti-GST-vel kapcsolt szenzorchip felületére. A His-MYPT1¹⁻⁶³³, His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ (N-terminális fragmentumok) fehérjéket a CM5 chip felületére közvetlenül, a fehérjék szabad amino-csoportjain keresztül immobilizáltuk 10 mM

Na-acetát (pH 5,0) jelenlétében. A kötődött fehérjék és peptidek mennyiségét a rezonancia jel (RU) növekedésének mértékéből határoztuk meg. 1000 RU megfelel 1 ng fehérje immobilizálásának, ami 6 mg/ml felületi fehérjekoncentrációt jelent (Toth és mtsai, 2000b). Az egyes fehérjék esetén az alábbi mértékű immobilizáció történt: GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴: 550±50 RU; GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴: 820±58 RU; His-MYPT1¹⁻⁶³³: 1701 RU; His-MYPT1¹⁻²⁹⁶: 876 RU; His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹: 3011 RU. A CN-MYPT1 kölcsönhatás kinetikai paramétereinek (asszociációs és disszociációs állandók) meghatározására a CN-t 1; 2,5; 5 µM koncentrációban 25 mM Tris-Cl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT és 1,5 mM CaCl₂ összetételű pufferben injektáltunk a felszínre. A kísérletek során a fehérjék asszociációját 7 percig követtük, a disszociációs fázisban pedig a kötődő fehérje nélküli puffert injektáltunk 5 percig. A CN kötődését az immobilizált fehérjékhez a jel (RU) növekedéseként regisztráltuk az idő (s) függvényében, és az így kapott görbéket (szenzogrammok) analizáltuk. A kontroll felszínen (GST-vel vagy etanolammal blokkolt felület) kapott jelet kivontuk a fehérjével borított felszíneken kapott kötődési értékekből. A fehérje injektálása után a felszíneket 10 mM glicin-HCl (pH 2,1) oldattal regeneráltuk. A kompetíciós kísérletek során a CN és MYPT1 kötődését vizsgáltuk a GST-MYPT1-hez két különböző elrendezésben: (1) a GST-MYPT1 felületre CN-t (3,5 µM) vagy PP1c-t (3,5 µM) külön-külön vagy együttesen injektáltunk; (2) először a GST-MYPT1 kötött felületet PP1c-vel (3,5 µM) telítettük, majd CN-t (3,5 µM) és PP1c-t (3,5 µM) együttesen injektáltunk. A PP1c folyamatos injektálására azért van szükség, hogy elkerüljük a PP1c-MYPT1 prekomplex disszociációját. A szenzogrammok kiértékelését a BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével végeztük egyszerű 1:1 arányú komplex képződését feltételezve, Langmuir kölcsönhatási modell alkalmazásával.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A BPAEC és HPAEC sejteket steril üveg fedőlemezeken (d=12 mm) növesztettük komplett médiumban, 100 %-os konfluencia eléréséig. A lemezeket PBS oldattal mostuk, majd 3,7 % paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS-ben 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. Minden lépést követően a lemezeket 3x mostuk PBS-sel. A sejteket 0,02 % Triton X-100-at tartalmazó PBS-vel permeabilizáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Blokkoláshoz steril, 1 % BSA-t tartalmazó PBS-t használtunk (1 óra, 4 °C-on). A fedőlemezeken lévő fixált, permeabilizált sejteket 0,1 % BSA/PBS-vel 1:100-1:150 arányban hígított elsődleges antitestekkel inkubáltuk 2-6 órán át 4 °C-on. A sejteket 3x mostuk PBS-el, majd az F-aktin kimutatására Texas Red-falloidint, a további fehérjék kimutatására Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-t („zöld”) és Alexa 546-konjugált anti-egér IgG-t („piros”) alkalmaztunk 1:150

hígításban, sötétben 60 percig, 4 °C-on. Mosást követően a fedőlemezeket Prolong Gold Antifade médium segítségével (mely DAPI-t is tartalmazott magfestésre) a tárgylemezekre rögzítettük. A mintákat Nikon Eclipse TE300 fluoreszcens mikroszkóppal (60× nagyítású objektív, NA 1.35), ill. Olympus Fluoview 1000 konfokális mikroszkóppal (Hamburg, Germany) vizsgáltuk. Ez utóbbi esetben 60× UPLSAPO (NA 1.35) olaj immerziós objektívet alkalmaztunk, az egyes fluorofórok gerjesztése Hélium/Neon (Alexa 546) és Argon-ion (Alexa 488 és GFP) lézerekkel történt. A magfestést higanygőzlámpa segítségével ellenőriztük. Az emittált fluoreszcenciát 585±30 és 515±15 nm-es sávszűrőkkel detektáltuk.

A digitalizált felvételeket az AxioVision 3.1 vagy az Olympus Fluoview 1000 szoftver programok segítségével készítettük, majd a Photoshop képkészítő szoftvert alkalmaztuk a megjelenítéshez (Adobe Systems). A konfokális blende méretét az 1µm-es optikai rétegvastagság eléréséhez megfelelő értékre állítottuk. A képeket az alábbi beállításokkal vettük föl: 512x512 pixel, 12 bit felbontás, 6,4 µs pixel idő, 2x soronkénti átlagolás (line-averaging). Minden több csatornánál detektált felvételt multi-track üzemmódban készítettünk. Az egy-egy fluorofórral jelölt kontrollok azonos beállítás mellett a többi csatornába nem világítottak át.

A fehérjék kolokalizációjának a mértékét a Pearson-féle korrelációs koeficiens (C értékek) meghatározásával adtuk meg, a CNA α -nak és a MYPT1-nek megfelelő „zöld” és „piros” csatornák pixel intenzitása alapján. Az Olympus konfokális mikroszkóp FV1000 szoftverével csak lineáris kontrasztnövelés történt, mely a megjeleníthető tartománynak a legmagasabb és legalacsonyabb határa közé estek. A korrelációs koeficiens számolása nem a Photoshop szoftverrel módosított képekből történt, hanem az eredeti OIB képekből. Egy 3x3-mas Gauss szűrővel történt simítás a képeket illetően a digitális zaj csökkentése érdekében. A threshold a háttér fluoreszcenciája fölötti érték volt, annak beállítása sejtmentes területeken történt.

Áramlási citometriai analízisek

Az EC esetében a transzfekciók hatékonyságának és a kezelések citotoxikus hatásának a megítélésére áramlási citometriai analíziseket végeztünk. A sejteket 6 lyukú sejttenyésztő edényben 90-100 %-os konfluenciáig növesztettük és 50 nM trombinnal 30 percig, 0,1 µM FK506-al 4 óráig vagy 2 µM CsA-val 4 óráig kezeltük. Kombinált kezelések esetén a sejteket előinkubáltuk trombinnal 30 percig, ezt követően pedig FK506-al vagy CsA-val kezeltük a fent leírtak szerint. Pozitív kontrollként H₂O₂-dal kezelt (1 mM, 4 óra) EC-t használtunk. A sejteket propídium jodiddal (PI) festettük (5 µg/ml, 30 perc), kétszer mostuk PBS-el,

tripszineztek, majd centrifugálással összegyűjtöttük (1200 x g, 10 percig) és 1 ml jéghideg PBS-ben szuszpendáltuk. Az elpusztult, ill. élő sejtek arányát (20000 sejtre) áramlási citometriás analízissel határoztuk meg FACSCalibur készülékkel (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). A CNA konstruktok transzfekciós hatékonyságának megállapításához a sejteket Petri-csészében 90-100 %-os konfluenciáig növesztettük és a fent leírt módon transzfektáltuk. 48 órával később a sejteket ($1,1 \times 10^6$ sejt) tripszineztek, és áramlási citometriával elemeztük. A citometriás mérések során az egyes fluoroflóroknak megfelelő csatornák a következők voltak: FL-1: gerjesztésre Ar-ion lézer 488nm-es vonalát használtuk, a detektálási oldalon 530 ± 15 nm-es m sávszűrőt alkalmaztunk és FL-2: gerjesztésre Ar-ion lézer 488nm-es vonalát használtuk, a detektálási oldalon 585 ± 21 nm-es m sávszűrőt alkalmaztunk. A citometriás mérések során a BD FACSCalibur készülék Cytoscape szoftverét használtuk.

A MLC20^{Ser19} foszforilációs szintjének meghatározásához szintén alkalmaztunk áramlási citometriai analízist. A BPAEC-t szövettenyésztő edényekben 100 %-os konfluenciáig növesztettük. A BPAEC szérum-mentes médiumban kezelés nélküli kontrollként szolgált, amelyet 50 nM trombin (10 perc), 2 μ M CsA (30 perc) vagy 2 μ M CsA (30 perc) előinkubálást követő 50 nM trombin (10 perc) kezelésekkkel hasonlítottunk össze. Kezeléseket követően a sejteket TBS-sel mostuk, majd tripszinezés után a sejtuszuspenziót centrifugáltuk (3000 rpm, 6 perc) és fixáltuk 3,7 % PFA-t tartalmazó TBS-ben 10 percig szobahőmérsékleten. Minden inkubációs lépést követően 3x mostuk a sejteket TBS-vel. Mosásokat követően 0,02 % Triton X-100-at tartalmazó TBS-sel permeabilizáltunk 15 percig szobahőmérsékleten. Blokkoláshoz 1 % BSA-t tartalmazó TBS-t használtunk (1 óra, 4 °C-on). Az anti-MLC20^{pSer19} antitestet 1:100 arányban 0,1 % BSA/TBS-vel hígítva alkalmaztuk 6 órán át 4 °C-on. A sejteket TBS-sel 3x mostuk, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-vel (zöld) inkubáltuk (1:150 hígítás, 60 percig 4 °C-on, sötétben). Mosást követően a sejteket 1 ml PBS-ben szuszpendáltuk és FACSCalibur készülékkel 5000 sejtet számolva határoztuk meg a fluoreszcencia intenzitást.

Adatok elemzése, kiértékelése

Az eredmények átlagának, ill. szórásának kiszámításához a GraphPad Prism 5.0 programot használtuk. A statisztikai szignifikanciát szintén GraphPad Prism 5.0 program segítségével, a kezeletlen és a kezelt csoportok között a kétmintás t-próbával ill. egyutas ANOVA-val határoztuk meg, amelynek során $p < 0,05$ esetekben tekintettük a változásokat

szignifikánsnak (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). A megadott eredmények 3-4 független kísérlet adatainak átlaga \pm SEM.

A Western blot-ok értékelésekor a képeket már digitalizált formában nyertük a FluorChem FC2 (multiimager) géldokumentációs rendszerrel (Cell Biosciences), amelynek kiértékelő szoftverével végeztük el a kívánt fehérjesávok denzitometriás analízisét.

Az immunfluoreszcens képek szerkesztése az Adobe Photoshop CS5 képszerkesztő programmal történt.

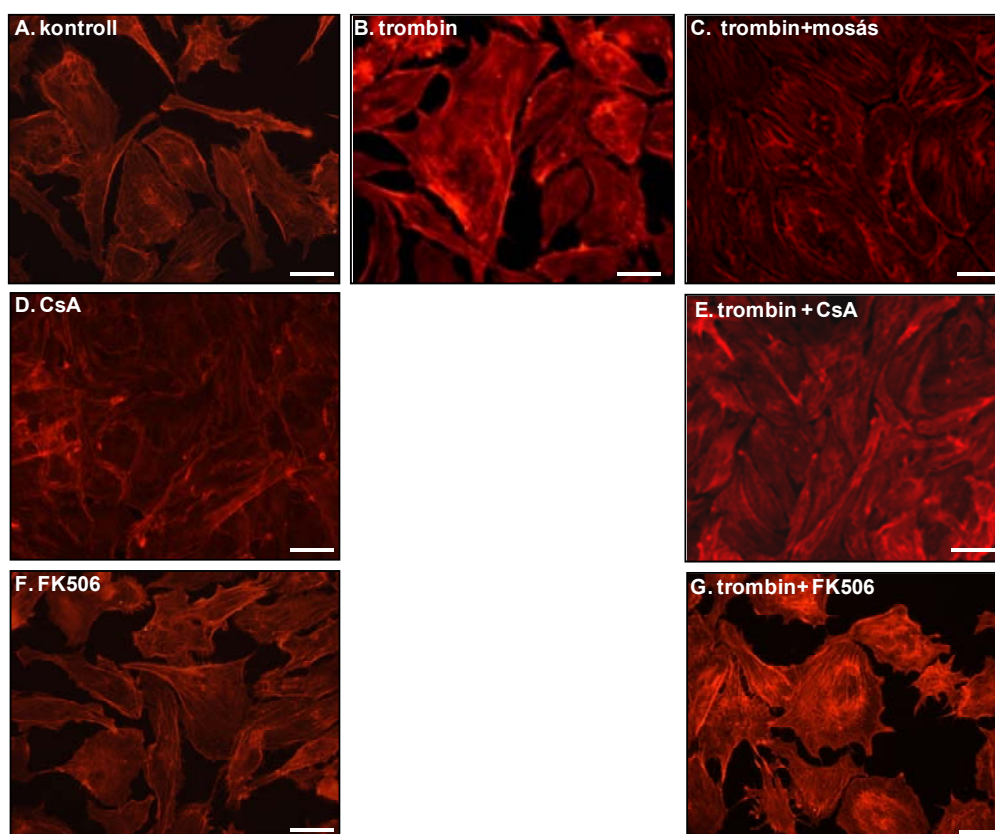
EREDMÉNYEK

A CN szerepe a trombin-indukált aktin-citoszkeleton átrendeződésben

Először azt kívántuk tanulmányozni, hogy a CN milyen szerepet játszhat az endotél sejtek (BPAEC) citoszkeletonális átrendeződéseiben. Ezt kétféle kísérletsorozattal közelítettük meg: (1) először a CN inhibitorok hatását vizsgáltuk a trombin-indukált stressz-kábel képződésre; (2) ezt követően a CNA konstruktok overexpressziójának hatását tanulmányoztuk a trombin által okozott szerkezeti változásokra.

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.



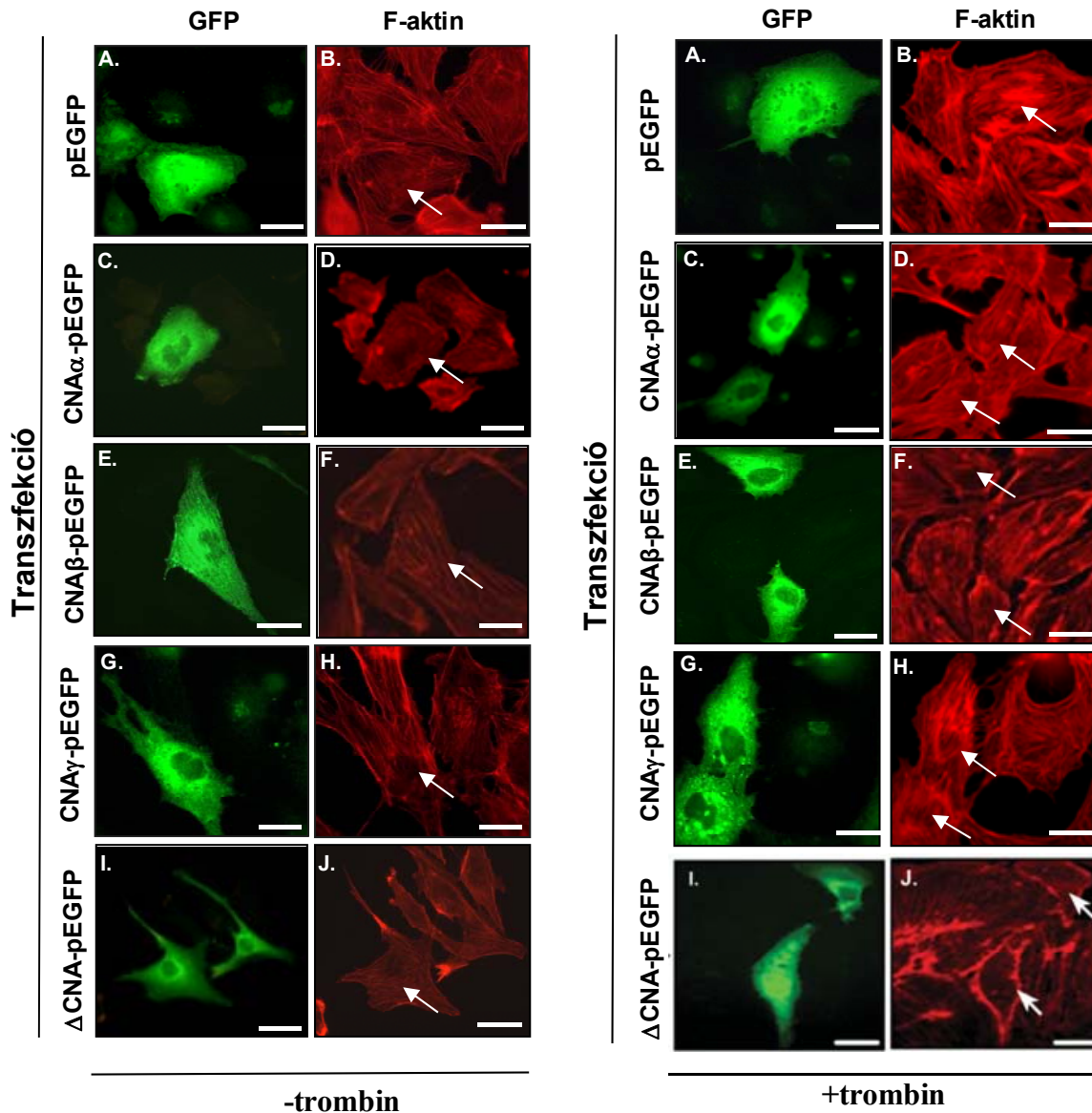
6. ábra. A CN gátlásának hatása a trombin-indukált stressz-kábelek kialakulására BPAEC sejtekben. Az EC kezelése az alábbiak szerint történt: (A) kezeletlen kontroll; (B) 50 nM trombin (30 perc); (C) 50 nM trombin (30 perc) kezelést követően a trombint kimostuk és ezt követően a sejteket sérumentes médiumban tartottuk (4 óra); (D) 2 μ M CsA (4 óra); (E) 50 nM trombin (30 perc) előinkubálást követően 2 μ M CsA (4 óra); (F) 0,1 μ M FK506 (4 óra) (G) 50 nM trombin (30 perc) előinkubálást követően 0,1 μ M FK506 (4 óra). A kezeléseket után a sejteket fixáltuk és az F-aktint detektáltuk az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. Az ábrán három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. Skála hossza: 20 μ m.

Az F-aktin filamentumok jelölésére Texas Red-falloidint használtunk. A 6. ábra fluoreszcens képei bemutatják, hogy BPAEC-ben 30 perces 50 nM trombinnal történő kezelés következtében (6. B. ábra), a kontroll sejtektől (6. A. ábra) eltérően, az aktin fokozott polimerizációja és stressz-kábelek kialakulása figyelhető meg. A stressz-kábelek az immunfluoreszcens felvételeken erősebben festődő aktin filamentumok formájában, piros színnel láthatóak, mennyiségük trombin kezelést követően jelentősen nő. Ha a trombin kezelést követően a sejteket mostuk és 4 óra időtartamra szérumentes médiumban tartottuk, akkor a BPAEC-ben a stressz-kábelek számának csökkenését és a citoszkeleton szerkezetének a kontrollhoz hasonló mintázatú visszarendeződését figyeltük meg (6. C. ábra). Amikor önmagában CsA-val (2 μ M, 4 óra), a CN gátlószerével kezeltük az BPAEC-eket nem tapasztaltunk lényeges változást az aktin-citoszkeleton szerkezetében (6. D. ábra), viszont ha a 30 perces trombin előkezelést követően 4 óráig CsA-val kezeltük a sejteket megfigyelhető volt, hogy a trombin kezelés következtében kialakult stressz-kábelek hosszabb ideig fennmaradtak (6. E. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a CN gátlása meghosszabítja a trombin kezelés következtében kialakult barrier diszfunkciót az aktin-citoszkeleton visszarendeződésének gátlásával. A másik CN gátlószerrel, az FK506-al történő kezelés önmagában nem befolyásolta az aktin-citoszkeleton szerkezetet (6. F. ábra), míg a CsA-hoz hasonlóan trombin előkezelést követve a trombin kezelés következtében kialakuló aktin-citoszkeleton változások tovább fennmaradtak (6. G. ábra).

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

Annak tisztázására, hogy milyen szerepük van a különböző CNA izoformáknak az EC citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, klónoztuk a CNA α , β , γ izoformáit. Rendelkezésünkre állt a CNA konstitutív aktív, rövidített α izoformát (Δ CNA) kódoló plazmid is, amelyben a katalitikus alegységéből hiányzik az autoinhibitor (AI) és a kalmodulin-kötő (CaM) domén. A GFP (kontroll) és a CNA izoformák overexpressziója sem a kezeletlen (7. A-H, bal oldali ábrarész), sem a trombin-kezelt sejtekben (7. A-H, jobb oldali ábrarész) nem befolyásolták az EC aktin-citoszkeleton szerkezetét. Ezzel szemben az aktív Δ CNA overexpressziója a trombin kezelést követően (7. I, J jobb oldali ábrarész) csökkentette a transzfektált sejtekben a stressz-kábelek számát, amely a CN szerepét jelzi az aktin-citoszkeleton szerkezeti változások szabályozásában. Áramlási citometriás analízissel vizsgáltuk a transzfekciók hatékonyságát, valamint a CsA, FK506 és trombin kezeléseket, ill. a

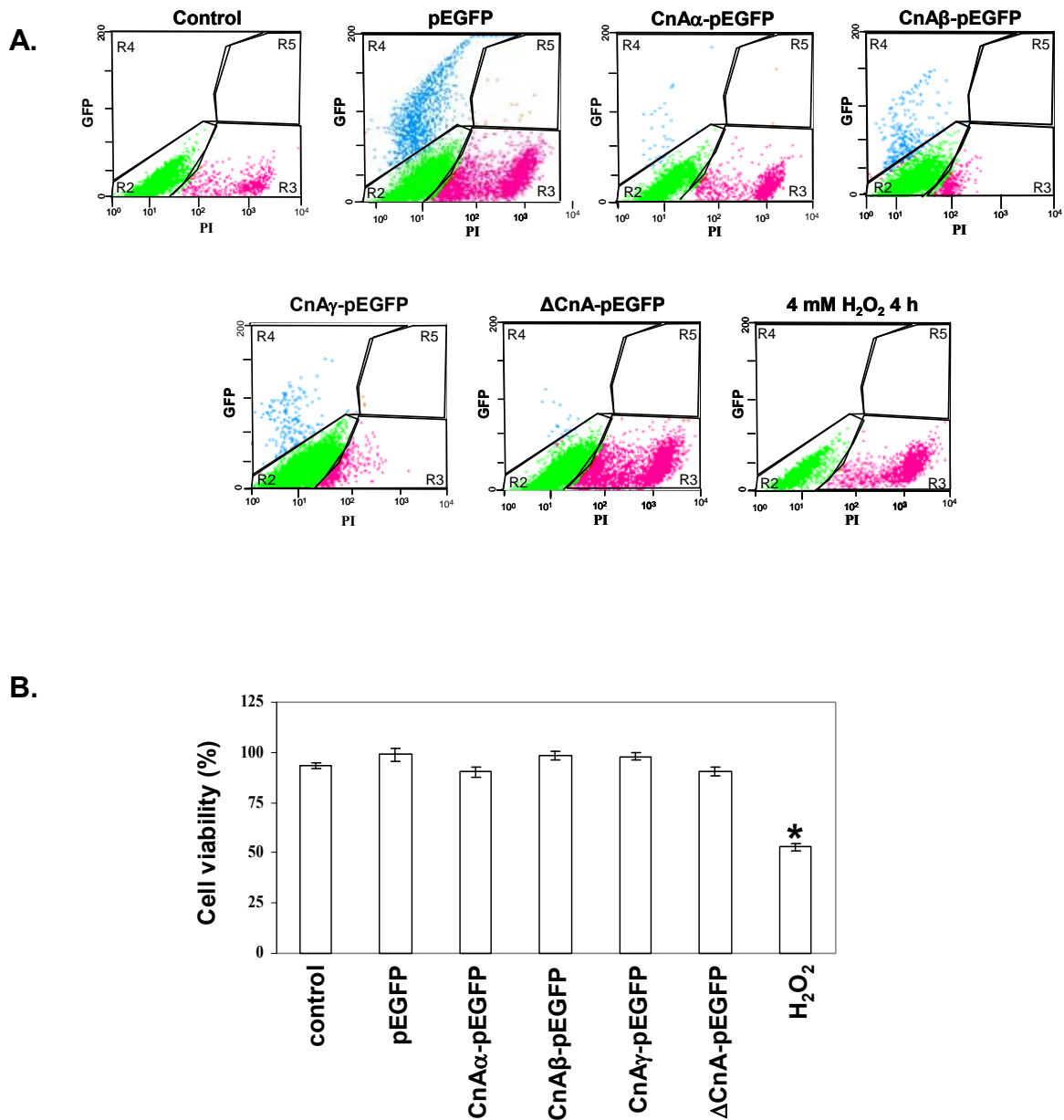
transzfekciók hatását a sejtek életképességére (8. ábra). Kimutattuk, hogy a CsA, FK506 és trombin kezelések nem befolyásolták az EC életképességét (nem bemutatott adatok).



7. ábra. A CNA izoformák overexpressziójának hatása a trombin-indukált stressz-kábel képződésre EC-ben. PFA-val fixált EC-ben az F-aktint Texas Red-falloidinnal jelölve immunfluoreszcenciával detektáltuk az aktin-citoszkeleton szerkezeti változásokat. Az ábra bal oldalán a kezeletlen, jobb oldalán a trombin kezelt (50 nM, 30 perc) sejtek láthatók, ill. a transzfekciókat követően a GFP (A, B), CNA α -pEGFP (C, D), CNA β -pEGFP (E, F), CNA γ -pEGFP (G, H) és a Δ CNA-pEGFP (I, J) overexpressziójának hatása az aktin-citoszkeleton szerkezetére. A nyilak a transzfektált sejteket jelzik. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményei láthatók. Skála hossza: 20 μ m.

A transzfekciókat követően a sejtek életképességét az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint mértük (8. ábra). A 8. A ábrán az R2 régió a nem-transzfektált, az R3 a nem-transzfektált és propídium-jodid (PI) pozitív, az R4 a GFP pozitív transzfektált, az R5 régió pedig a kétszeresen pozitív sejteket tartalmazza. A transzfekciók hatékonysága

ezekkel az emlős expressziós konstrukciókkal igen alacsony, mindössze 5-10 %-ra tehető. A GFP, CNA α -pEGFP, CNA β -pEGFP, CNA γ -pEGFP és a Δ CNA-pEGFP plazmidok transzfekciója nem befolyásolta az EC életképességét. Pozitív kontrollként H₂O₂-ot (4 mM, 4 óra) alkalmaztunk, ami szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét (8. B ábra).



8. ábra. A transzfekciók hatékonyságának (A) és a sejtek életképességének (B) vizsgálata áramlási citometriával. (A) a dot-plotok a GFP-vel és a CNA izoformákkal transzfektált BPAEC-eket mutatják. (B) a sejtek életképessége, a transzfektált sejtek százalékában kifejezve: $(R4/R4+R5) \times 100$ a kontroll esetében és $(R2/R2+R3) \times 100$ a H₂O₂-al kezelt sejtekben, ahol R2, R3, R4 és R5 a sejtszámot jelentik a megfelelő régiókban. A CNA izoformák transzfekciója nem befolyásolta a sejtek életképességét. A * jelzi a szignifikáns változást a kontroll mintához képest ($P < 0,05$).

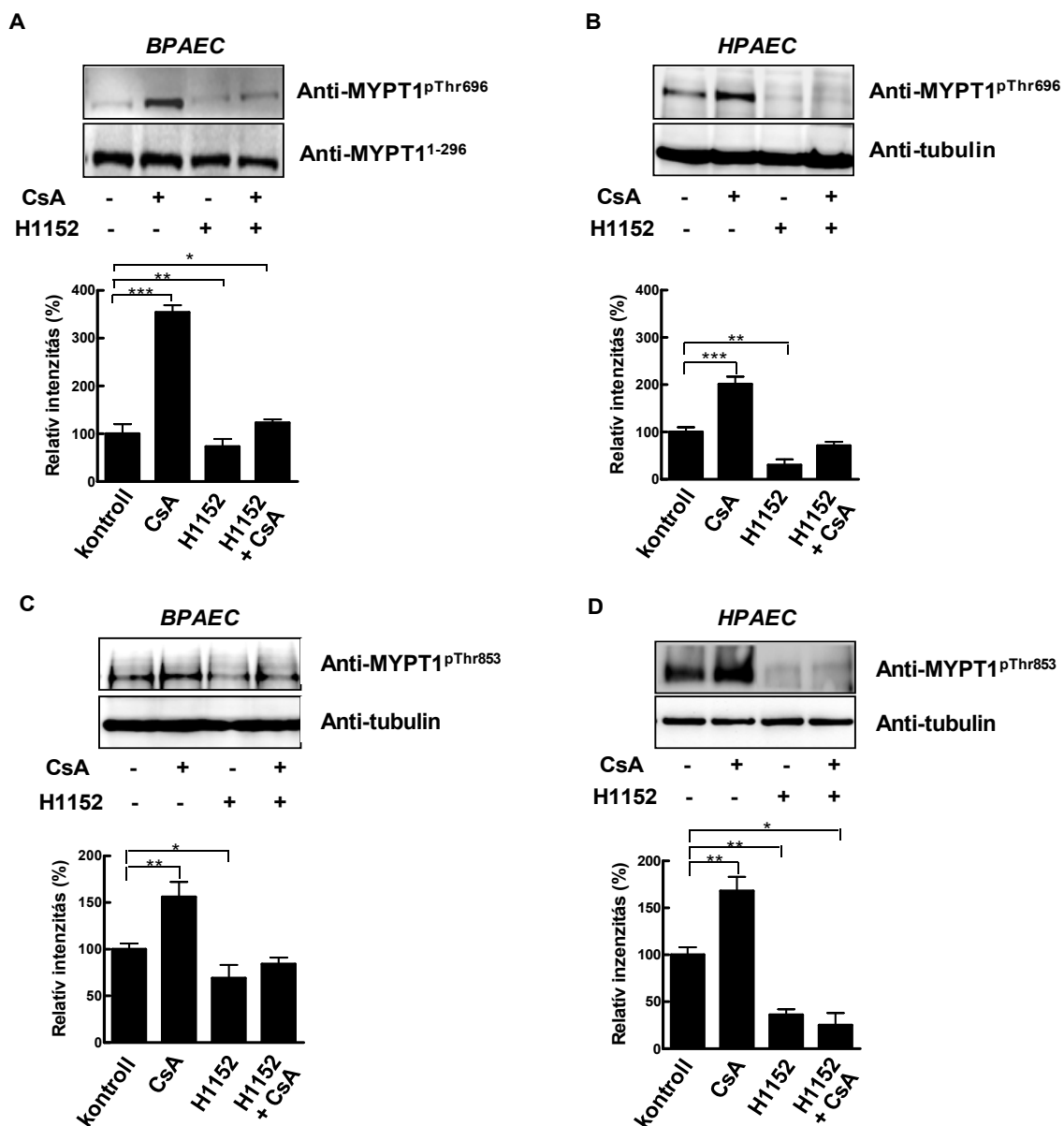
A CN szerepe a MP MYPT1 alegységének defoszforilációjában

A CN inhibitorok és a CN aktív katalitikus fragmentjének hatása az EC stressz-kábel képződésére felvetette, hogy a CN-nak szerepe lehet a MLC20 foszforilációjának szabályozásában is. Korábbi eredmények alapján feltehető, hogy a CN *in vitro* és *in vivo*, közvetlenül nem defoszforilálja a MLC20-at (Verin és mtsai, 1998 és Takizawa és mtsai, 2002b), ezért a CN közvetett szerepét feltételeztük a MP szabályozásán keresztül, elsősorban a MYPT1 regulátor alegység gátló foszforilációs helyeinek (Thr696 és Thr853) defoszforilációjában.

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

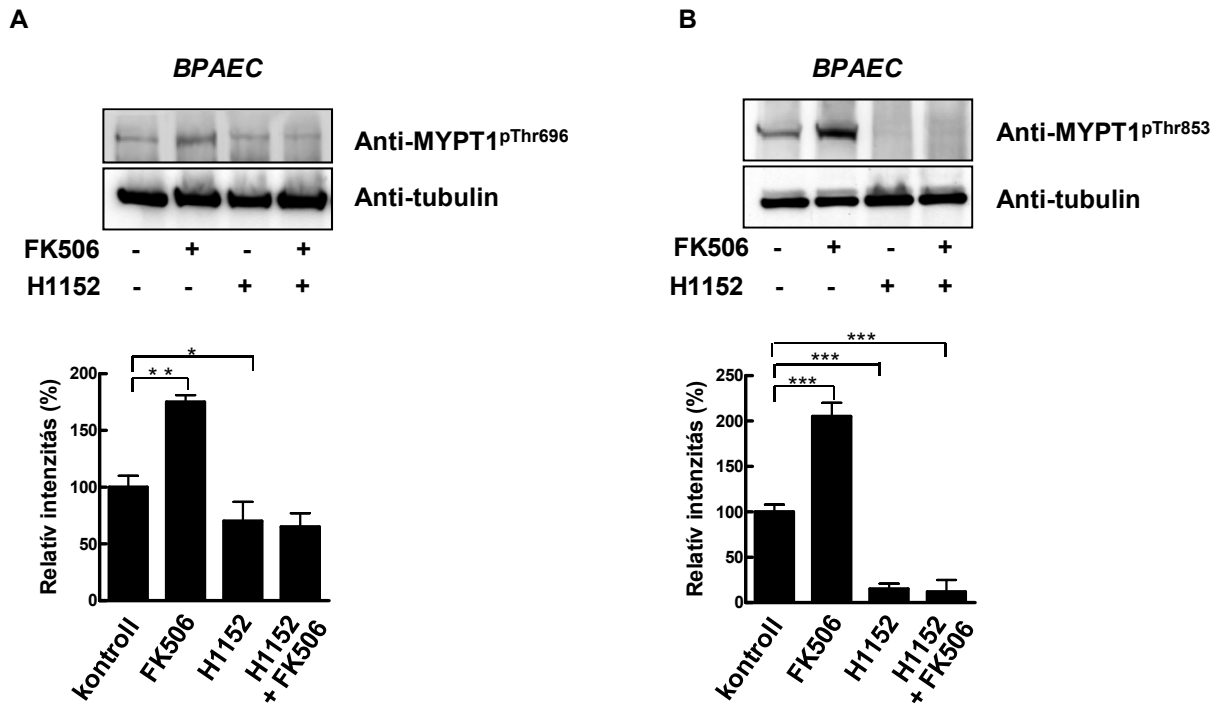
Megvizsgáltuk a MYPT1 gátlást okozó foszforilációs helyeinek defoszforilációját BPAEC és HPAEC sejtekben. A kezdeti kísérletekben a CN szerepére a defoszforilációban a CsA-nak, a CN egyik specifikus inhibitorának az alkalmazásával kívántunk adatokat nyerni. BPAEC-eket CsA-val kezeltünk és vizsgáltuk a MYPT1 MP aktivitást gátló helyei (Thr696 és Thr853) foszforilációs szintjének változását Western blot módszerrel, anti-MYPT1^{pThr696} és anti-MYPT1^{pThr853} antitesteket alkalmazva. Kezeletlen sejtekben a Thr696 és Thr853 oldalláncok kismértékben foszforilált formában vannak jelen (9. A-D ábra). CsA kezelés hatására a Thr696 oldallánc foszforilációs szintje BPAEC-ben jelentősen (~3,5-szeresére) emelkedett (9. A ábra), míg ez a növekedés HPAEC-ben szignifikáns, de kisebb mértékű (~2,1-szeres) volt (9. B ábra). A CsA kezelés hasonlóan emelte a Thr853 oldallánc foszforilációs szintjét, de ez az emelkedés kisebb mértékű mindkét sejttypusban, mint a Thr696 oldallánc esetében (9. C és D. ábra). Vizsgáltuk azt is, hogy a MYPT1-et foszforiláló ROK felelős-e a CsA által indukált Thr696 és Thr853 foszforilációs szint emelkedésért. H1152-vel, a ROK specifikus gátlószerével kezelt sejtekben a Thr696 és Thr853 oldalláncok CsA által indukált foszforilációs szintjének növekedése nem figyelhető meg (9. A-D. ábra), ami a ROK szerepére utal ebben a foszforilációs folyamatban.

FK506, a CN másik gátlószerének hatását is tanulmányoztuk a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációjára BPAEC-ben (10. ábra). 2 μ M FK506 kezelés hatására mindkét oldallánc foszforilációs szintje emelkedett, kisebb mértékben a Thr696 (~1,7-szeresére), nagyobb mértékben a Thr853 oldalláncon (~2,1-szeresére) (10. A-B ábra). A H1152-vel előkezelt sejtekben azonban a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjének növekedése viszont nem észlelhető (10. A-B. ábra).



9. ábra. A CN inhibitor (CsA) valamint a ROK gátlószer (H1152) hatása a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjére EC-ben. Konfluens BPAEC-t (A, C) és HPAEC-t (B, D) kezeltünk 2 μ M CsA-val, 10 μ M H1152-vel 30 percig vagy 10 μ M 30 perces H1152-vel való előkezelést követően 2 μ M CsA-val 30 percig szérummentes médiumban. A kezeltetlen sejteket szérummentes médiumban inkubáltuk (kontroll). A MYPT1 foszforilációját a Thr696 és Thr853 oldalláncokon anti-MYPT1^{pThr696} és anti-MYPT1^{pThr853} antitestekkel Western blottal detektáltuk. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására tubulin vagy MYPT1 kontrollt használtunk. A bemutatott fehérje sávok kvantitatív analizését denzitometrállással végeztük el. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

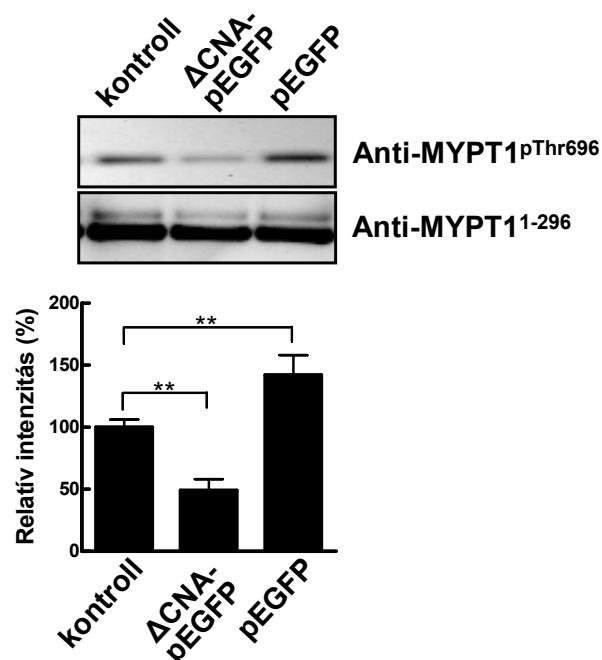
További kísérleteinkben a CsA-t használtuk a CN specifikus gátlószerként. Eredményeink azt sugallják, hogy a MYPT1 foszforilált Thr696 és Thr853 oldalláncaikat EC-ben a CN defoszforilálja.



10. ábra. A CN inhibitor (FK506) valamint a ROK gátlószer (H1152) hatása a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjére. Konfluens BPAEC-eket kezeltünk 2 μ M FK506-val, 10 μ M H1152-vel 30 percig vagy 10 μ M 30 perces H1152-vel való előkezelést követően 2 μ M FK506-val 30 percig szérummentes médiumban. A kezeletlen sejteket szérummentes médiumban inkubáltuk (kontroll). A MYPT1 foszforilációját Western blot módszerrel a Thr696 és Thr853 oldalláncokon anti-MYPT1^{pThr696} (A) és anti-MYPT1^{pThr853} (B) antitestekkel analizáltuk. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására tubulin kontrollt használtunk. A bemutatott fehérje sávok kvantitatív analizisét denzitometráással végeztük el. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

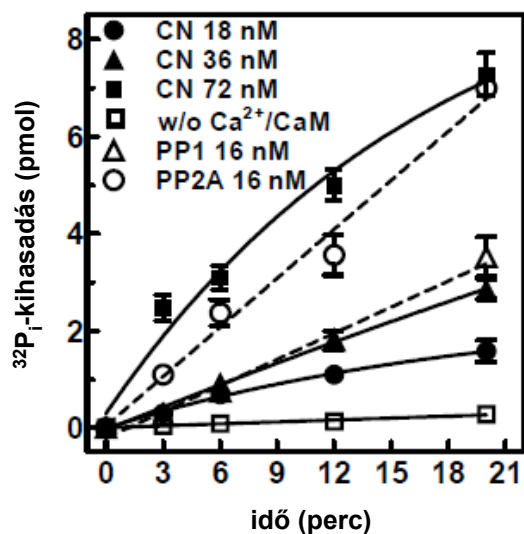
A CN szerepe a MYPT1 közvetlen defoszforilációjában in vivo és in vitro

Az endogén MYPT1^{pThr696} defoszforilációjában tehát a CN hatékonyan részt vehet, amely bizonyítására további *in vivo* kísérletet végeztünk tsA201 sejtekben. A sejteket pEGFP-vel vagy Δ CNA-pEGFP (konstitutív aktív, rövidített CN-t kódoló) konstrukttal transzfektáltuk, és megvizsgáltuk az overexpresszált fehérjék hatását a MYPT1^{pThr696} oldallánc foszforilációs szintjére. A MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének százalékos változását a blot-ok denzitometráásával adtuk meg (11. ábra, alsó rész). Kontrollként (100 %) a nem-transzfektált sejtek MYPT1^{pThr696} szintje szolgált. A Δ CNA-pEGFP overexpressziója 49 \pm 9 %-ra (n=3) csökkentette, míg a pEGFP önmagában inkább növelte (142 \pm 41 %) a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjét. Ezek az adatok szintén arra utalnak, hogy a CN közvetlenül részt vesz a MYPT1^{pThr696} oldallánc defoszforilációjában.



11. ábra. A CNA konstitutív aktív (Δ CNA-pEGFP) forma overexpressziójának hatása a MYPT1 Thr696 oldallánc foszforilációs szintjére tsA201 sejtekben. A tsA201 sejteket pEGFP-vel és Δ CNA-pEGFP konstrukttal transzfektáltuk az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. A MYPT1 foszforilációját a Thr696 oldalláncon anti-MYPT1^{pThr696} antitesttel detektáltuk Western blottal. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására a mintákban a MYPT1-et is detektáltuk. A bemutatott fehérje sávok kvantitatív analízisét denzitometráással végeztük el. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Az *in vivo* kísérletek mellett *in vitro* foszfatáz aktivitás mérésekkel is bizonyítani kívántuk, hogy a CN képes közvetlenül defoszforilálni a foszfo-MYPT1-et. Más foszfatáz típusoknak is szerepe lehet a foszfo-MYPT1 defoszforilációjában, ezért aktivitásméréseket végeztünk a tisztított CN-on kívül a tisztított PP1c és PP2Ac katalitikus alegységekkel is. A mérésekhez szubsztrátként ROK-al ³²P-ATP jelenlétében a Thr696 és Thr853 oldalláncon foszforilált rekombináns GST-MYPT1-et alkalmaztunk. A 12. ábrán látható, hogy a CN idő és koncentráció-függő módon hatékonyan defoszforilálja a ³²P-MYPT1-et, és ez a defoszforiláció Ca²⁺/CaM-függő folyamat. A tisztított PP1c és PP2Ac katalitikus alegységekkel végzett aktivitásmérések kinetikája is hasonló volt. Ezek az adatok is bizonyítják tehát, hogy a CN közvetlenül részt vesz a foszfo-MYPT1 defoszforilációjában.



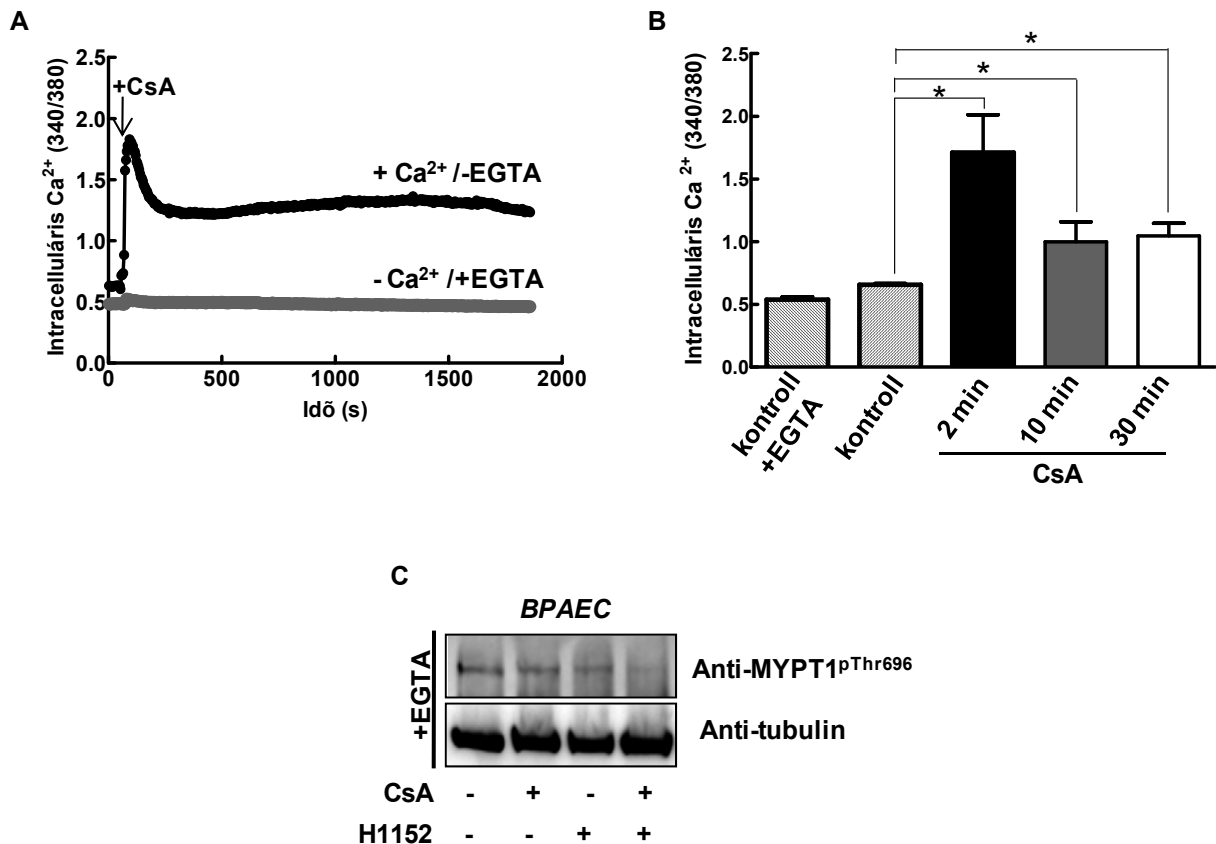
12. ábra. A ³²P-MYPT1 defoszforilációja tisztított CN, PP1c és PP2Ac által. 0,5 μM ³²P-MYPT1 (1,6 mol foszfát/mol MYPT1) szubsztrátból a CN által, 0,2 mM Ca²⁺ és 40 μg/ml CaM jelenlétében vagy jelenléte nélkül, a jelzett koncentrációkban (18, 36, 72 nM) és időintervallumokban (3, 6, 12, 20 perc) kihatott ³²P_i mennyiségét határoztuk meg. A Ca²⁺/CaM jelenléte nélkül mért mérések esetén a CN-t 72nM koncentrációban alkalmaztuk. A ³²P-GST-MYPT1 defoszforilációját tisztított PP1c-vel és a PP2Ac-vel (16-16 nM) is meghatároztuk.

A CsA hatása az EC [Ca²⁺]_i szintjére BPAEC-ben

A MYPT1 Ca²⁺/CaM-függő defoszforilációja a CN által (lásd 12. ábra) felvetette azt a kérdést is, hogy hogyan vezethet nyugvó sejtekben a CsA kezelés, azaz a CN gátlása vélhetően alacsony [Ca²⁺]_i szint és CN aktivitás mellett a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének nagymértékű emelkedéséhez EC-ben. Megvizsgáltuk tehát a CsA kezelés hatását a BPAEC [Ca²⁺]_i változására és azt találtuk, hogy a CsA kezelés jelentős [Ca²⁺]_i emelkedést indukál, ami az extracelluláris Ca²⁺ jelenlététől függ (13. A ábra). CsA hozzáadása előtt extracelluláris Ca²⁺ jelenlétében, a 340/380 nm gerjesztési arány értéke 0,66±0,01, míg extracelluláris Ca²⁺ hiányában (EGTA jelenlétében) 0,54±0,02. A CsA-indukált [Ca²⁺]_i emelkedés tranzienst, 2 percen belül éri el a maximumát (1,71±0,30), majd csökken, de még a CsA-val történő inkubációs periódus végén (30 perc) is magasabb szinten marad (0,99±0,16), mint a kiindulási [Ca²⁺]_i érték (13. B ábra).

Megvizsgáltuk a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének változását is CsA és H1152 kezeléseket követően, extracelluláris Ca²⁺ hiányában. Azt találtuk, hogy extracelluláris Ca²⁺ hiányában a CsA kezelés nem befolyásolta, míg a H1152 kismértékben csökkentette a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjét (13. C ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy CsA kezelés hatására az [Ca²⁺]_i átmenetileg emelkedik és fenntartott marad extracelluláris Ca²⁺

jelenlétében, valamint ez a CsA okozta tranziens $[Ca^{2+}]_i$ növekedés előfeltétele a MYPT1^{pThr696} oldallánc foszforilációs szint növekedésének.

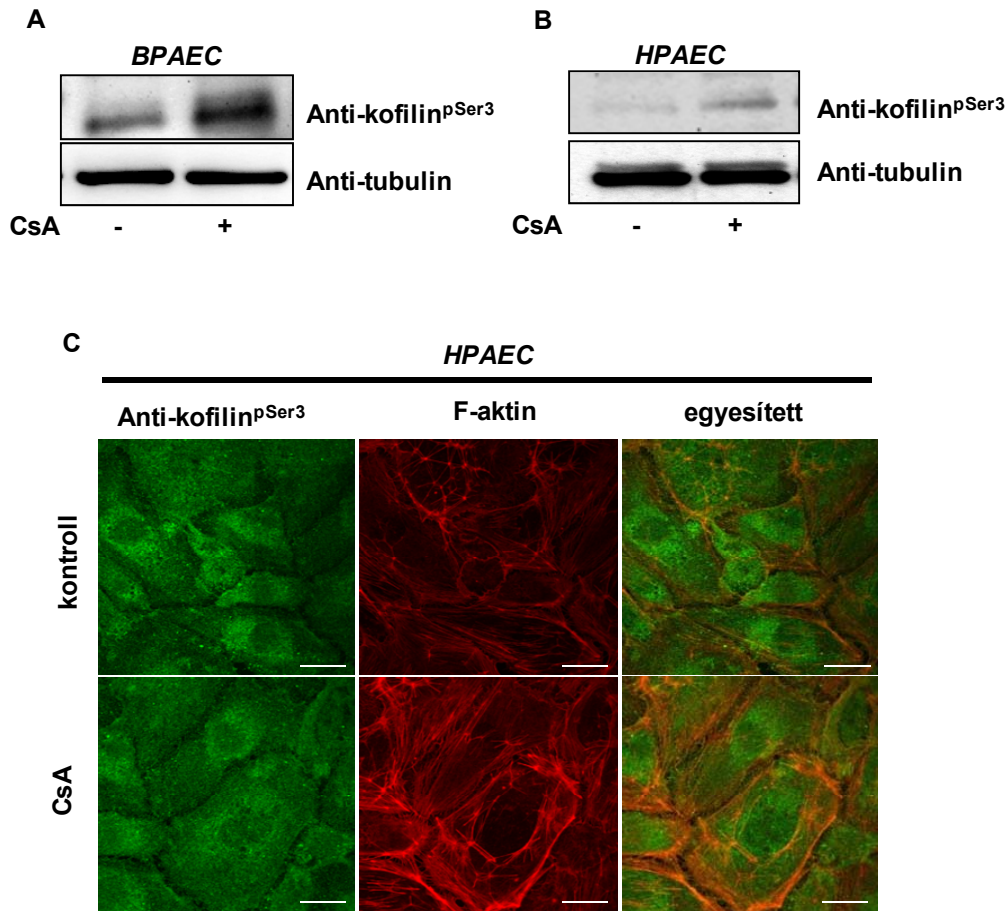


13. ábra. A CsA kezelés hatása az BPAEC $[Ca^{2+}]_i$ valamint a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjére. **A:** A sejteket 2 μ M CsA-val 30 percig kezeltünk és az $[Ca^{2+}]_i$ változását Fura-2 Ca^{2+} -szenzitív fluoreszcens festékkel feltöltött sejtekben mértük. Minden egyes sejt 340/380 nm gerjesztési arány értékét kiszámítottuk, összesen 23-26 EC átlagának válaszidejét mértük. Az extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében (+ Ca^{2+} /-EGTA) vagy hiányában (- Ca^{2+} /+EGTA) egy-egy reprezentatív kísérlet eredménye látható. **B:** Az oszlopdiagram az átlagos válaszokat (340/380 nm gerjesztési arány értékét) ábrázolja, 4-7 független kísérletből, összesen 92-99 sejtől számítva. **C:** A CsA és H1152 kezelések hatása a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjére BPAEC-ben, extracelluláris Ca^{2+} jelenléte nélkül. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A CN szerepe a kofilin foszforilációs szintjének szabályozásában

Az emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ a CN aktivációjával párosul, melyet összefüggésbe hoztak a kofilin^{pSer3} defoszforilációját katalizáló Slingshot foszfatáz aktiválásával HeLa sejtekben (Wang és mtsai., 2005). Ennek megfelelően fontosnak tartottuk megvizsgálni a CN gátló szer CsA hatását a kofilin^{pSer3} foszforilációjára is. Mind BPAEC és HPAEC sejtekben CsA kezelést követően növekedett a kofilin^{pSer3} szintje (14. A-B ábra). Immunfluoreszcenciával is kimutattuk a kofilin^{pSer3} szintjének és az F-aktin mennyiségének növekedését HPAEC-ben. Az

egyesített képeken megfigyelhető, hogy a feldúsult F-aktin és a foszfo-kofilin a sejtek kortikális aktin filamentumai mentén kolokalizálnak (14. C. ábra).



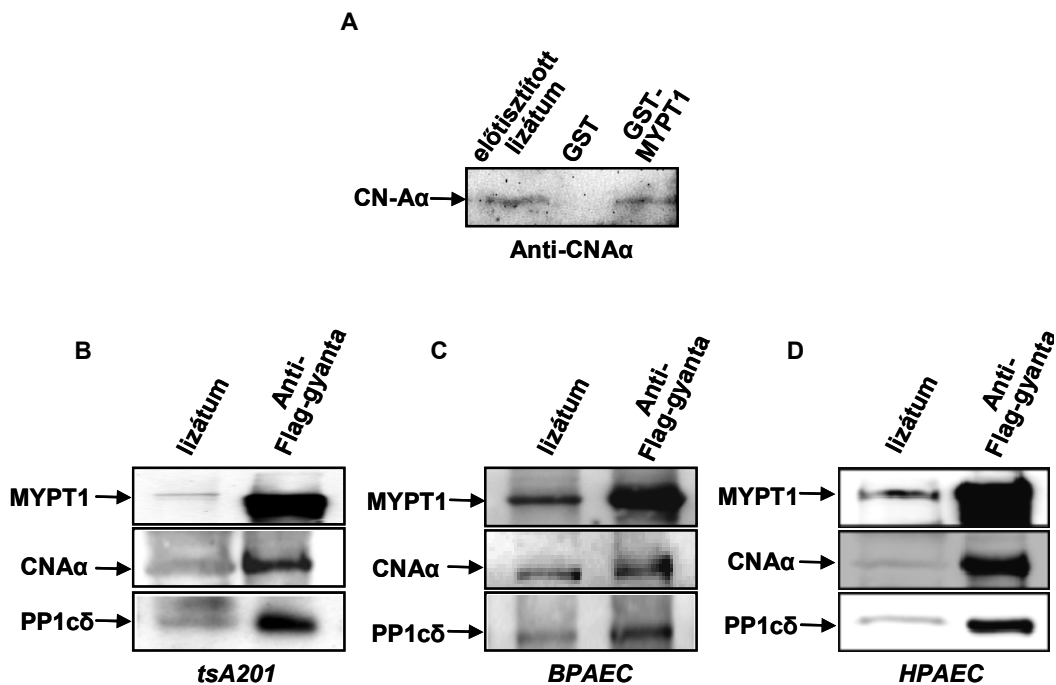
14. ábra. A CsA kezelés hatása a kofilin^{Ser3} foszforilációs szintjére BPAEC és HPAEC. A és B: A kofilin foszforilációját a Ser3 oldalláncon anti-kofilin^{pSer3} antitesttel Western blottal detektáltuk. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására tubulin kontrollt használtunk. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív blotját mutatjuk be. C: A CsA hatása a kofilin^{pSer3} foszforilációjára és az aktin-citoszkeleton szerkezetre HPAEC sejtekben immunfluoreszcenciával. HPAEC-et steril fedőlemezeken növesztettük fel, majd a konfluens sejteket 2 μ M CsA-val 30 percig kezeltünk. A kontroll minta a kezeletlen sejteket jelöli. A sejteket anti-kofilin^{pSer3} (zöld) antitesttel és Texas Red falloidinnel (piros) jelöltük. Az egyesített képek a két fehérje kolokalizációját szemléltetik. Skála hossza: 10 μ m.

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

Tanulmányoztuk, hogy a CN és a MYPT1 között egyszerű enzim-szubsztrát kölcsönhatás van-e, vagy pedig e két fehérje a MYPT1 foszforilációja nélkül is stabil komplexet alkot, aminek jelentősége abban rejlik, hogy kölcsönhatásuk biztosíthatja közelségüket a biológiai szabályozási folyamatokban.

A CN és MYPT1 kölcsönhatás kimutatása EC és tsA201 sejtekben

A CN és a MYPT1 fehérjék kölcsönhatásának fiziológiai jelentőségét először pull-down kísérletekkel vizsgáltuk. A foszforilálatlan GST-MYPT1-et ill. GST-t (kontroll) Glutation-Sepharose gyantához kapcsolunk, majd előtisztított BPAEC lizátummal kevertettük 4 órán át, majd a kapcsolt és az azzal kölcsönható fehérjéket SDS-mintapufferben szolubilizáltuk. A CN-t anti-CNA α antitesttel azonosítottuk immunobloton, ami a GST-MYPT1 és az endogén CN kölcsönhatását igazolta BPAEC-ben, míg a GST kontrollal kötődés nem látható (15. A. ábra). Flag-MYPT1 pull-down kísérletekben szintén a fenti kölcsönhatást tanulmányoztuk a MYPT1, valamint kölcsönható fehérjéi között (15. B, C, D ábra) tsA201, BPAEC és HPAEC sejtek lizátumából.

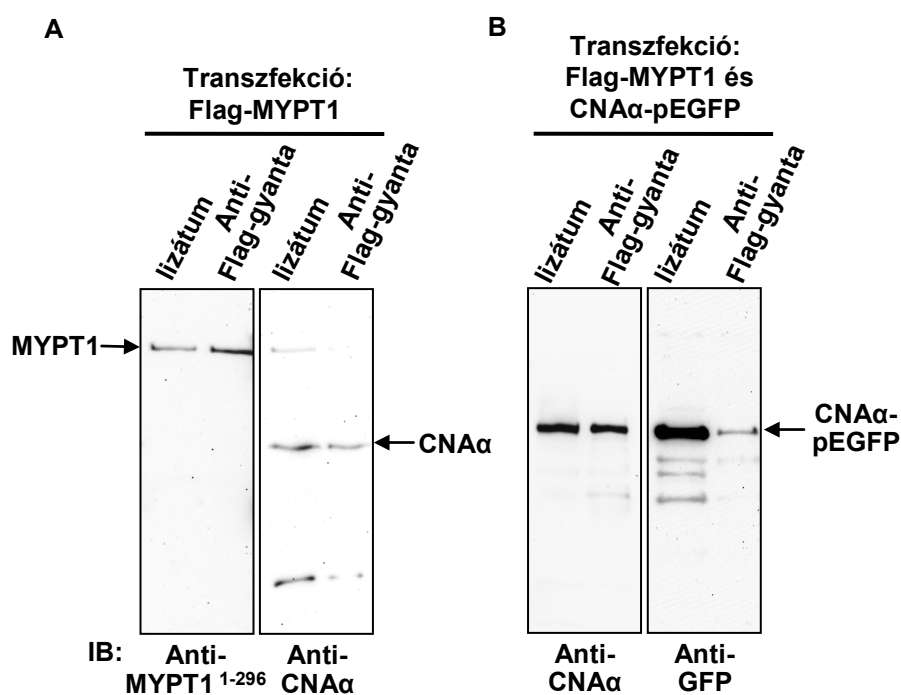


15. ábra. A CN és MYPT1 kölcsönhatás kimutatása pull-down vizsgálatokkal. A: GST-vel (kontroll) és GST-MYPT1 fehérjével kapcsolt glutation-Sepharose gyantát inkubáltunk BPAEC lizátummal, a kötődő fehérjét anti-CNA α antitesttel detektáltuk. A MYPT1, CN és PP1c δ koprecipitációja tsA201 (B), BPAEC (C) és HPAEC (D) sejtek lizátumából Flag-MYPT1 pull-down kísérletben. A membrán három részre vágása után, a kötődő fehérjéket anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-CNA α és anti-PP1c δ antitestek segítségével azonosítottuk Western blottal.

A koprecipitációt Flag-MYPT1-kapcsolt anti-Flag gyantával végeztük el. A Flag-MYPT1-et tsA201 sejtek lizátumából tisztítottuk és a MYPT1-el kölcsönható fehérjéket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint távolítottuk el. Ezt követően a Flag-MYPT1 gyantát, amelyről eltávolítottuk a kötődő alegységeket és fehérjéket, inkubáltuk a BPAEC és HPAEC lizátumokkal. A kötődő fehérjéket, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-CNA α és anti-PP1c δ antitestek

segítségével Western blot analízissel azonosítottuk. A Flag-MYPT1 a CN-al és a PP1c δ -val is kölcsönhatást mutatott (15. B, C, D ábra) tsA201 sejtekben, valamint BPAEC- és HPAEC-ben is, amely azt is bizonyítja, hogy a CN és a MYPT1 kölcsönhatása nem akadályozza meg a PP1c és a MYPT1 kölcsönhatását.

A tsA201 sejteket Flag-MYPT1 és/vagy CN-A α /pEGFP emlős expressziós plazmidokkal transzfektáltuk, ill. kotranszfektáltunk. A Flag-gyantát sejt-lizátumokkal inkubáltuk. Az overexpressziót követően ebben az esetben is Western blottal azonosítottuk a Flag-MYPT1 kölcsönhatását az endogén CN-al (16. A. ábra) és a CNA α -pEGFP-vel is (16. B ábra). Ezek az adatok ismételtelen megerősítették a MYPT1-nek az endogén, ill. az overexpresszált CN-al történő kölcsönhatását is.

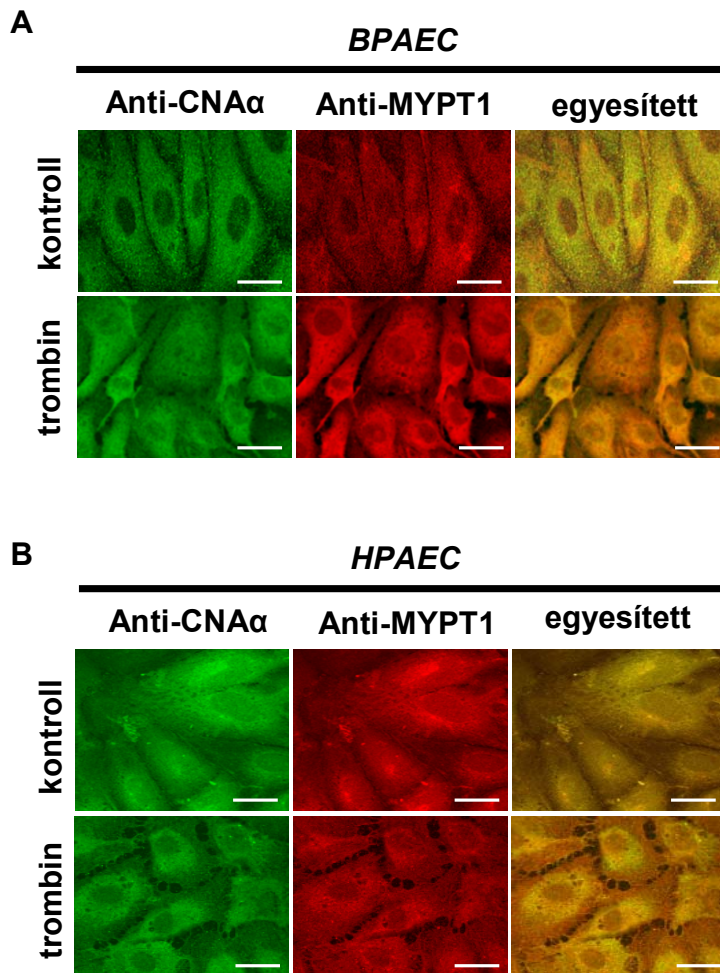


16. ábra. A CN és MYPT1 kölcsönhatás kimutatása koexpressziós pull-down kísérletekkel. A: Overexpresszált Flag-MYPT1 és az endogén CN kölcsönhatása tsA201 sejtekben. A Flag-MYPT1 pull-down vizsgálatokat az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint végeztünk el, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-CNA α antitestekkel. B: Overexpresszált Flag-MYPT1 és CNA α -pEGFP kölcsönhatása tsA201 sejtekben. A Western blot analízishez anti-CNA α és anti-GFP antitesteket használtunk fel. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be.

A CN és MYPT1 kolokalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával

A pull-down kísérletek a MYPT1 és CN sejtben belüli kölcsönhatását feltételezik, ezért a továbbiakban a fehérjék lokalizációját vizsgáltuk EC-ben konfokális mikroszkóppal. A sejteket fixálás után a MYPT1-re és a CN-ra specifikus antitestekkel jelöltük, majd az immunreakció detektálására fluoreszcens festékkel konjugált második antitesteket alkalmaztunk. A fehérjék sejtben belüli eloszlása és kolokalizációja a 17. ábrán látható.

Kontroll sejtekben (17. A és B ábra, felső sorok) megfigyelhető, hogy a CN (zöld) és a MYPT1 (piros) kismértékben a sejtmagban, nagyobb mértékben az endotél sejtek citoplazmájában lokalizálódott. A két fehérje kolokalizációját (egyesített képen) a citoplazmában és a sejtmagban is detektáltuk (17. A-B ábra). Trombin kezelés nem változtatta meg a CN és MYPT1 lokalizációját, ill. kolokalizációját sem BPAEC, sem HPAEC sejtekben.



17. ábra. A CN és MYPT1 kolokalizációja EC-ben. BPAEC (A) vagy HPAEC (B) sejteket steril fedőlemezeken, konfluens monolayerre felnövesztettük, majd trombin távollétében (kontroll) vagy 10 perces trombin kezelést követően fixáltuk, anti-CNA α (zöld) és monoklonális anti-MYPT1 (piros) antitestekkel jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal detektáltuk. Skála hossza: 10 μ m.

A kolokalizációk mértéket a Pearson-féle korrelációs koefficiens meghatározásával is kvantifikáltuk. A Pearson-féle korrelációs koefficiens, a kontroll BPAEC sejtekben $C=0,72\pm 0,09$ ($n=21$), HPAEC sejtekben: $C=0,86\pm 0,06$ ($n=20$), mely szintén igazolja az igen nagymértékű kolokalizációt a két fehérje között. Megvizsgáltuk a kolokalizáció mértékét a trombin kezeléseket követően is mindkét sejtvonal esetében. A Pearson-féle korrelációs koefficiens, a trombin kezelt BPAEC sejtekben: $C=0,71\pm 0,04$ ($n=11$), HPAEC sejtekben:

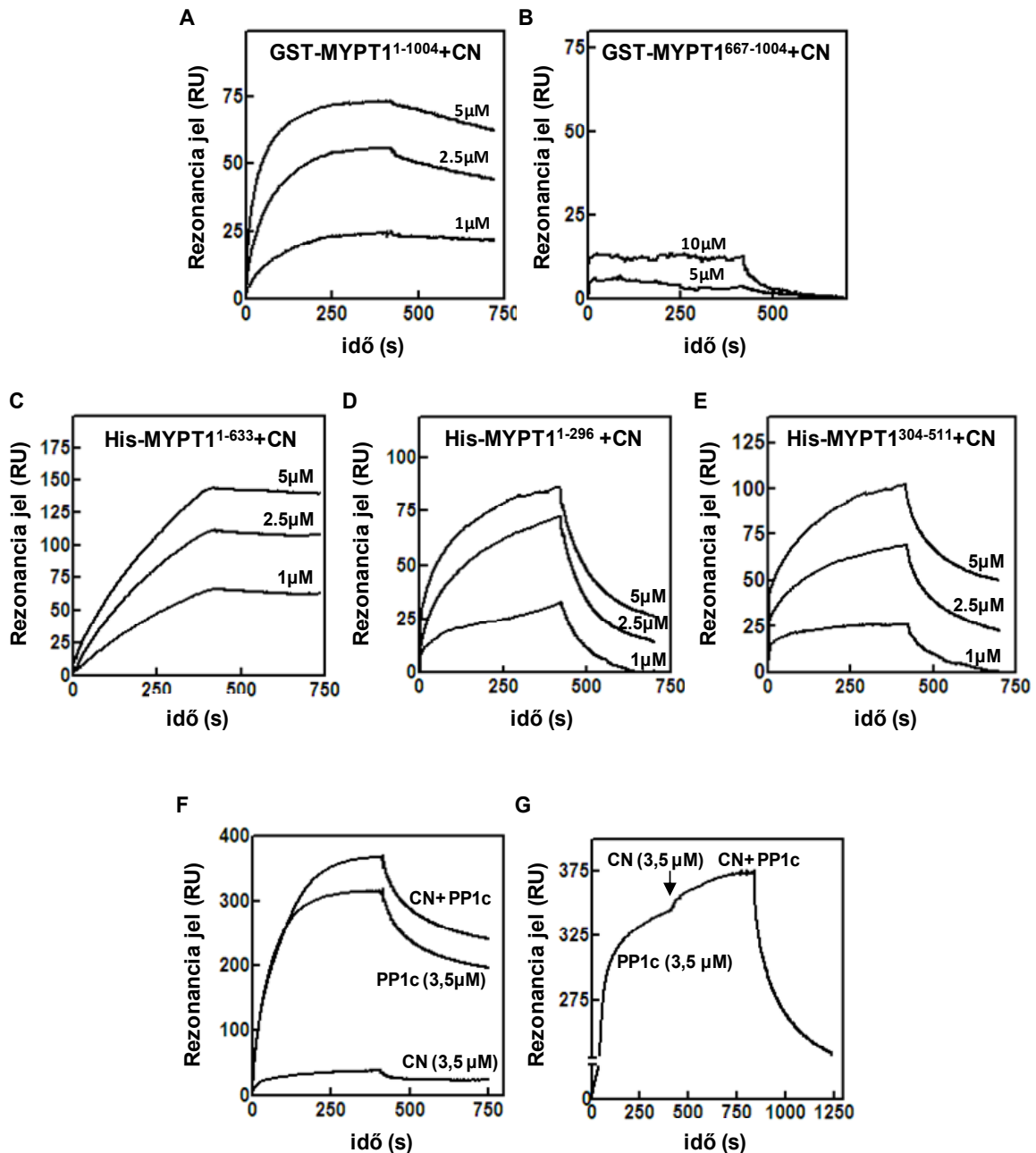
$C=0,75\pm 0,08$ ($n=17$) értékeknek adódott, ami arra utal, hogy a trombin kezelést követően is megmarad a nagymértékű kolokalizáció a citoplazmában és a magban a CN és MYPT1 között. Ezek az eredmények szintén alátámasztják a CN és a MYPT1 kölcsönhatásának valószínűségét EC-ben.

A CN és MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálata felületi plazmon rezonancia mérésekkel

Tanulmányoztuk CN-MYPT1 kölcsönhatás molekuláris hátterét, ezért megvizsgáltuk a CN kötődését a teljes, valamint a különböző hosszúságú MYPT1 fragmentumokhoz SPR kötődési módszerrel, tisztított fehérjéket használva. A kísérletek során a GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (teljes hosszúságú) és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (C-terminális fragmentum) fehérjéket az anti-GST-vel kapcsolt szenzorchip felületére (18. A, B, F, G ábra), míg a His-MYPT1¹⁻⁶³³, His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ (N-terminális fragmentumok) fehérjéket (18. C-E ábra) közvetlenül a szenzorchip felületére immobilizáltuk a fehérjék szabad amino-csoportjain keresztül. Ezt követően a felületekre CN-t (1-5 μM) injektáltunk, és mértük a kötődés következtében fellépő rezonanciajel-változást. A 18. A. ábrán bemutatott szenzogrammon látható, hogy a CN mindhárom alkalmazott koncentrációban (1; 2,5; 5 μM) kötődött a teljes hosszúságú GST-MYPT1-hez és a szenzogramok kiértékelése során kapott asszociációs egyensúlyi állandó értéke ($K_a=(1,86\pm 1,37)\times 10^7 \text{ M}^{-1}$) stabil kölcsönhatást sejtet a két fehérje között. Ezzel szemben a CN alig kötődött a GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴-hez, és még viszonylag magas CN koncentrációknál (5-10 μM) is csak kismértékű rezonancia-változást kaptunk. Ez arra utal, hogy a MYPT1 C-terminális fragmentuma nem játszik fontos szerepet a két fehérje közötti kölcsönhatás kialakításában (18. B ábra). Ezzel szemben a hosszabb N-terminális MYPT1 fragmentum (His-MYPT1¹⁻⁶³³) a teljes hosszúságú MYPT1-hez (GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴) hasonló, stabil komplexet alakított ki a CN-al ($K_a=(1,06\pm 0,04)\times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (17. C ábra). Ugyanakkor e két kölcsönhatás asszociációs és disszociációs kinetikája különbözött, ami arra utalhat, hogy a két fehérjén részben eltérő lehet a kötőhelyek állapota, ami akár az eltérő immobilizációs módszer alkalmazásából is adódhat. A CN kötődése a rövidebb (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶) és a középső (His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹) N-terminális MYPT1 fragmentumokhoz (18. D-E ábrák) kevésbé stabil komplexeket hozott létre ($K_a=(3,14\pm 1,06)\times 10^4 \text{ M}^{-1}$ és $K_a=(1,15\pm 0,52)\times 10^5 \text{ M}^{-1}$). A CN kötődéséből a különböző rekombináns MYPT1 fragmentumokhoz arra következtethetünk, hogy elsősorban az N-terminális és a középső MYPT1 régióknak van szerepe a MYPT1 CN-al való kölcsönhatásában.

A PP1c szintén a MYPT1 N-terminális régióihoz kötődik, ezért indokolt megvizsgálni, hogy esetleg a PP1c és a CN befolyásolhatják-e egymás kötődését. A 18. F ábrán látható,

hogy a két fehérje együttes injektálása során a külön-külön mért kötődések során kapott rezonanciajelek együttes injektálást követően összegeződnek. A 18. G ábrán látható szenzogrammon a CN injektálása olyan felületre történt, amelyen GST-MYPT1-PP1c komplexet hoztunk létre telítési kötődéssel. A CN ehhez a komplexhez is kötődött, ami arra utal, hogy a két fehérje MYPT1-hez történő kötődése független egymástól.

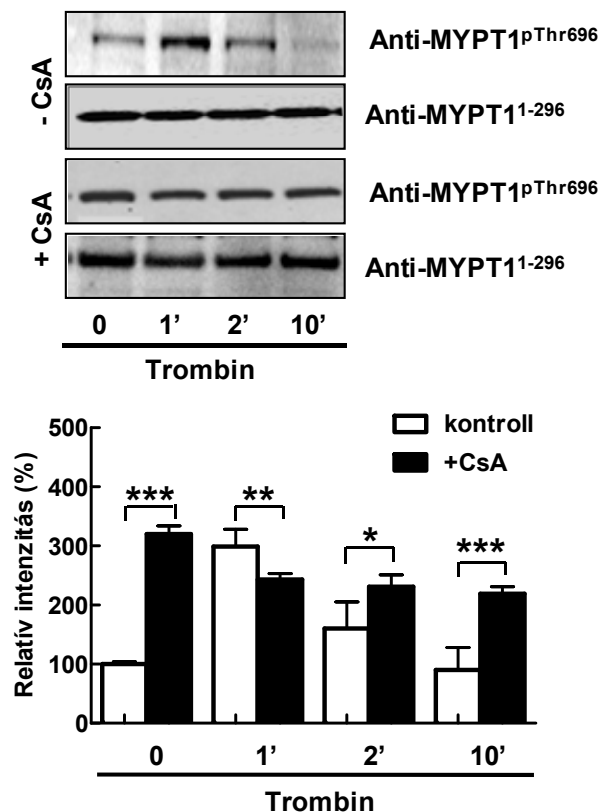


18. ábra. A CN és MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálata SPR módszerrel. CM5 chip felületére GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (A), GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (B), His-MYPT1¹⁻⁶³³ (C), His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (D), His-MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ (E) fehérjéket immobilizáltunk, majd e felületekre 1-5 μM koncentrációban CN-t injektáltunk. A kompetíciós kísérletek során a GST-MYPT1 felületre CN-t (3,5 μM) vagy PP1c-t (3,5 μM) külön-külön vagy együttesen injektáltunk (F); ill. először a GST-MYPT1 kötött felületet PP1c-vel (3,5 μM) telítettük, majd CN-t (3,5 μM) és PP1c-t (3,5 μM) együttesen injektáltunk (G).

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

Az eddig feltárt CN és MYPT1 kölcsönhatások fiziológiai jelentőségét az endotél funkciók szabályozásában betöltött szerepük teheti fontossá. A trombin előzetes irodalmi adatok alapján tranziens MLC20/miozin foszforilációt eredményez, ami átmeneti miozin foszfatáz gátlással párosul (Essler és mtsai., 1999). Ezért jogos lehet az a felvetés, hogy a CN gátlásával kialakuló fenntartott diszfunkció a MYPT1 fenntartott gátló foszforilációjával és ennek megfelelő fokozott miozin foszforilációval párosulhat. Ezért tanulmányoztuk a CN gátlás szerepét a MYPT1 foszforilációjában trombin kezelést követően.

A CsA hatása a MYPT1 gátló foszforilációjára trombin jelenlétében

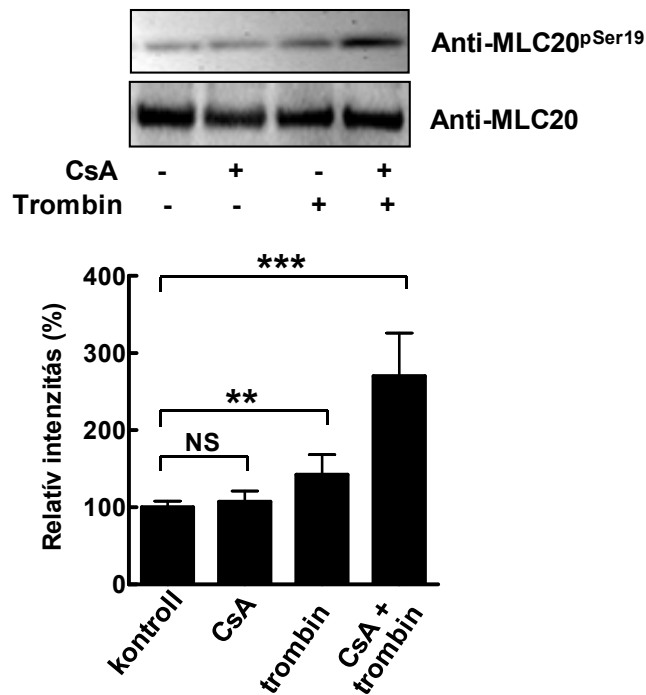


19. ábra. A CsA hatása a MYPT1 Thr696 oldallánc foszforilációjára trombin jelenlétében. Az EC-t CsA jelenléte nélkül, ill. 2 μ M CsA (30 perc) előkezelést követően 50 nM trombinnal 0, 1, 2, 10 percig kezeltük. Western blot analízissel vizsgáltuk a MYPT1 Thr696 oldalláncának foszforilációját anti-MYPT1^{pThr696} antitesttel, a felvitt minták fehérjetartalmának összehasonlítására a MYPT1 mennyiségét anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel határoztuk meg. A bemutatott fehérje sávok kvantitatív analízisét denzitometrállással végeztük el. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Megvizsgáltuk a MYPT1 MP aktivitást gátló foszforilációs helye (Thr696) foszforilációs szintjének változását trombin kezelést követően. BPAEC-eket trombinnal kezeltünk 0, 1, 2, 10 percig és vizsgáltuk a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének változását Western blot módszerrel anti-MYPT1^{pThr696} és anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesteket alkalmazva. Kezeletlen sejtekben a Thr696 oldallánc kismértékben foszforilált (19. A ábra), amely már 1 perces trombin kezelést követően jelentősen emelkedik (~3-szorosára). Ezt követően 2 és 10 perces trombin kezelése után a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintje fokozatosan csökken és 10 perc után már a kezeletlen kontroll értékhez hasonló. Eredményeink szerint tehát a trombin kezelés után tranziensen növekszik a MYPT1 foszforilációja a Thr696 gátló foszforilációs helyen. Ezzel szemben, amikor az EC-eket CsA-val (2 μ M, 30 perc) előkezeltük, már a trombin hozzáadása előtt jelentősen megnövekedett a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintje. Ez a MYPT1^{pThr696} szint trombin kezelés (1, 2, 10 perc) mellett szignifikánsan csökkent, de részlegesen fenntartott maradt viszonylag magas szinten (19. ábra) 10 perc trombin kezelés után is. Eredményeinket összegezve tehát a legszembetűnőbb különbséget a MYPT1^{pThr696} foszforilációjában a trombin és a kombinált CsA és trombin kezeléseket követően a 10 perces kezeléseknél észleltük.

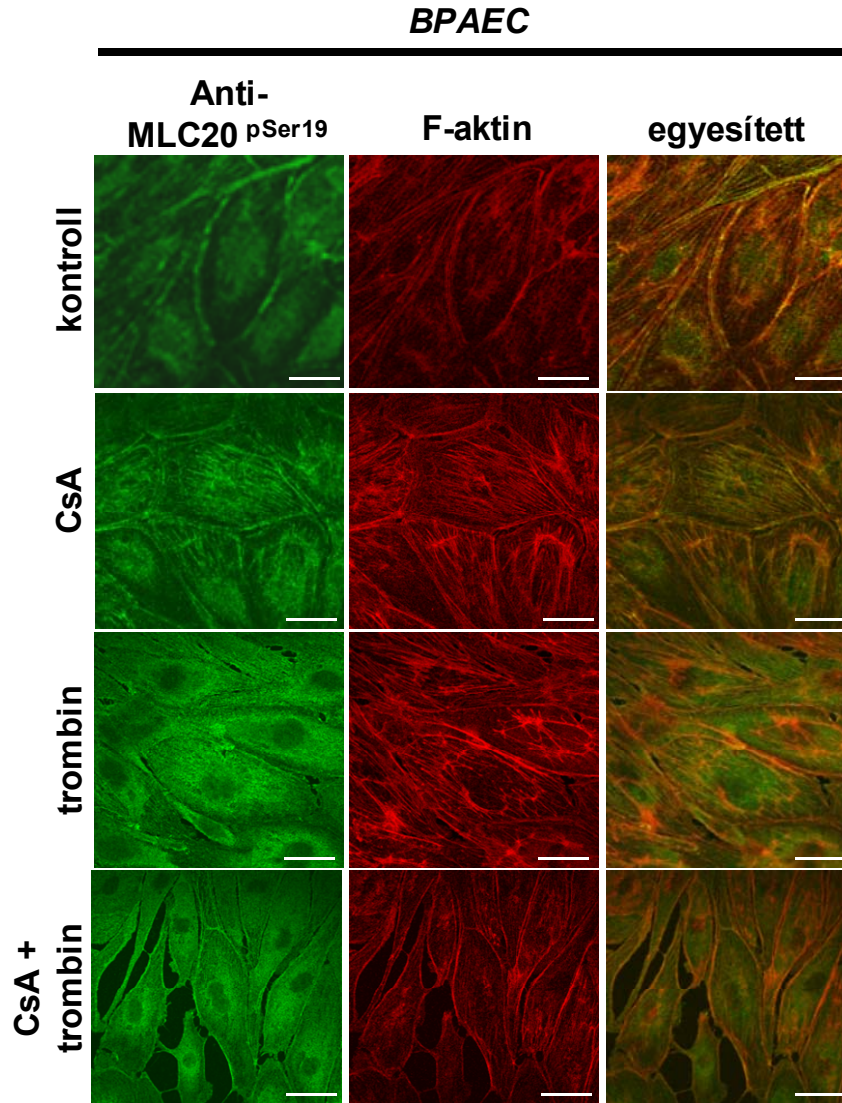
A CsA hatása a MLC20 foszforilációjára trombin jelenlétében

A MYPT1^{pThr696} eltérő foszforilációs szint változása CsA és trombin 10 perces kombinált kezeléseknél indokoltá tette annak vizsgálatát, hogy vajon a MP gátló foszforilációja tükröződik-e a MLC20 foszforilációs szintjének változásában is. Ezért megvizsgáltuk, hogy BPAEC-ben okoz-e hasonló változást a trombin kezelés önmagában, ill. CsA jelenlétében a MLC20^{pSer19} foszforilációs szintjében. A CsA (2 μ M, 30 perc) kezelés önmagában, de még a trombin (50 nM, 10 perc) kezelés is csak kismértékben növelte a MLC20^{pSer19} foszforilációs szintjét (20. ábra). Viszont ha a 10 perces trombin kezelést CsA kezelés előzte meg, akkor az MLC20^{pSer19} foszforilációs szintje szignifikánsan növekedett (20. ábra).



20. ábra. A CsA hatása a MLC20 foszforilációjára trombin jelenlétében. Az EC-t CsA jelenléte nélkül, ill. 2 μ M CsA (30 perc) előkezelést követően 50 nM trombinnal 10 percig kezeltük. Western blot analízissel vizsgáltuk a MLC20^{pSer19} foszforilációs szintjének változását anti-MLC20^{pSer19} antitesttel, a felvitt minták fehérjetartalmának összehasonlítására a MLC20 mennyiségét anti-MLC20 antitesttel határoztuk meg. Az immunoblot-ok kvantitatív analízisét denzitometrálassal végeztük el. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

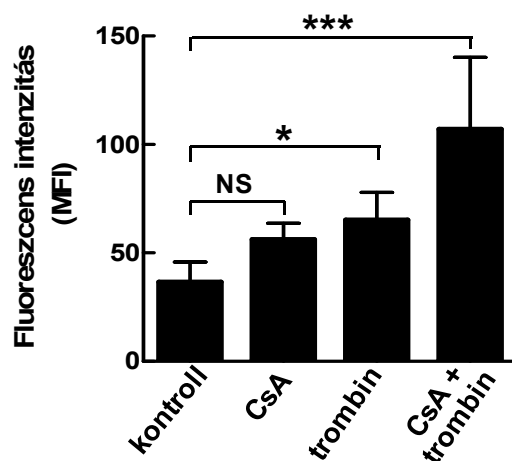
A CsA és trombin kezelések hatását a MLC20^{pSer19} foszforilációs szintjére immunfluoreszcenciával is detektáltuk BPAEC-ben. A MLC20 foszforilációs szintjének változását anti-MLC20^{pSer19} antitesttel detektáltuk, míg az F-aktin jelölésére Texas Red-falloidint használtunk (21. ábra). A 20. ábrán bemutatott változásokhoz hasonló mintázatú különbségeket kaptunk 30 perces CsA és 10 perces trombin, valamint CsA előkezelést követő trombin kezelés esetében is a MLC20^{pSer19} foszforiláció változásában immunfluoreszcenciás detektálással (21. ábra), ill. a jelzett MLC20 áramlási citometriával történő kvantitatív meghatározása alapján (22. ábra). Az immunfluoreszcenciás képeken megfigyelhető a stressz-kábelek mennyiségének növekedése CsA és trombin alkalmazása során (21. ábra).



21. ábra. A CsA és trombin kezelések hatása a MLC20 foszforilációjára immunfluoreszcenciával detektálással. A sejteket CsA jelenléte nélkül ill. 2 μ M CsA (30 perc) előkezelést követően 50 nM trombinnal 10 percig kezeltük. PFA-val fixált BPAEC-ben az MLC20 foszforilációs szintjét anti-MLC20^{pSer19} antitesttel és Alexa488 másodlagos antitesttel (zöld), az F-aktint Texas Red-falloiddinnel (piros) tettük láthatóvá. Az egyesített kép a két fehérje kolokalizációját mutatja. Skála hossza: 10 μ m.

A CsA-nak trombinnal történő kombinált alkalmazása a MLC20^{pSer19} foszforilációjának növekedését és kolokalizációját eredményezte a kortikális aktin filamentumokkal.

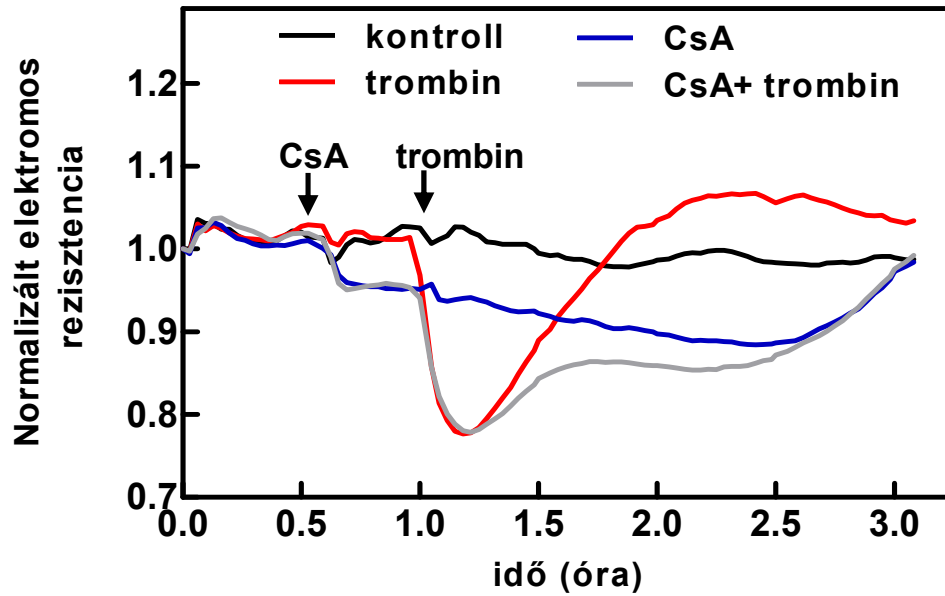
Összefoglalva eredményeinket, a CsA kezelés önmagában kismértékben, de nem szignifikánsan növeli a MLC20 foszforilációját EC-ben. Trombin kezelés (10 perc) mérsékelten növelte a MLC20 foszforilációját, ugyanis ebben az időpontban a MP már reaktiválódik, ami alacsonyabb foszforilációs szintet eredményez (lsd. 19. ábra). A CsA és trombin együttes jelenlétében a MLC20 foszforiláció emelkedett, ami feltehetően a MP fenntartott gátló foszforilációjával magyarázható.



22. ábra. A MLC20^{pSer19} foszforilációs szint változásának meghatározása CsA és trombin kezeléseket követően áramlási citometriás módszerrel. Kezeletlen (kontroll) BPAEC-et k 50 nM trombin (10 perc), 2 μ M CsA (30 perc) vagy 2 μ M CsA (30 perc) előinkubálást követő 50 nM trombin (10 perc) kezelt sejtekkel hasonlítottunk össze. A foszfo-MLC20-t anti-MLC20^{pSer19} antitesttel és Alexa488 másodlagos antitesttel (zöld) jelöltük, majd FACSCalibur készülékkel 5000 sejtet számolva határoztuk meg a fluoreszcencia intenzitás mértékét (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát az egyutas ANOVA-val határoztuk meg, $p < 0,05$ jelenti a szignifikáns különbséget. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A CN gátlás hatása az EC barrier funkciójára

A miozin foszforilációs szintjének változásai az endotél barrier funkció változásában is tükröződnek. Ezért megvizsgáltuk a transzendentél elektromos ellenállás (TER) változását a BPAEC monolayeren keresztül CsA és trombin, ill kombinált kezeléseket követően. A BPAEC monolayeret 2 μ M CsA-val és/vagy 50 nM trombinnal kezeltük. Látható, hogy CsA kezelés önmagában gyors, kismértékű, de szignifikáns, ellenállás csökkenést és viszonylag lassú (~2 óra) visszatérést eredményezett a kontroll (kezeletlen sejtekre jellemző) rezisztencia értékhez képest (23. ábra, kék görbe). A trombin önmagában még gyorsabb és nagyobb mértékű ellenállás csökkenést okozott, azonban a kontroll rezisztencia értékhez történő visszatérés is sokkal gyorsabban (45 percen belül) megtörtént (23. ábra, piros görbe). A CsA előkezelés majd ezt követően trombin kezelés nem változtatta meg a trombin által okozott csökkenés mértékét, viszont jelentős mértékben lassította (~1,5 óra) a normál rezisztencia értékhez való visszatérést (23. ábra, szürke görbe). A CN gátlása tehát jelentős mértékben meghosszabbítja a trombin-indukált barrier diszfunkció időtartamát endotél sejtekben.



23. ábra. A CN CsA által történő gátlásának hatása az endotél egysejtréteg elektromos ellenállására (TER). BPAEC-t arany elektródokkal bevont lemezekon konfluens monolayerre növesztettünk, majd a kiindulási TER mérések (kiindulási ellenállás 800-900 Ω) után, 2 μ M CsA-val és/vagy 50 nM trombinnal ill. 2 μ M CsA előkezelést követően 50 nM trombinnal kezeltük a sejteket (a nyilak a különböző ágensek hozzáadását jelzik). A méréseket 3 órán keresztül végeztük és az ábra a normalizált ellenállás értékeket mutatja be. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív grafikonját mutatjuk be.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A CN szerepe az endotél sejtek trombin-indukált kontrakciójában

Az endotél sejtek szemipermeábilis barriert képeznek az erek falában. A különböző szervek barrier funkciója eltérő, azonban számos közös jellemzőjük a transzcelluláris és paracelluláris integritás szabályozásában rejlik (Mehta és mtsai, 2006). A paracelluláris transzport folyamatok változásai nagymértékben hozzájárulnak a gyulladási folyamatokban kiváltott barrier diszfunkcióhoz. Irodalmi adatokból ismert, hogy a trombin-indukált endotél diszfunkció kialakulása a MLC20 foszforilációs szintjének növekedésétől függ, amely stressz-kábelek kialakulásához vezet (Bogatcheva és mtsai, 2002). Kevesebbet tudunk azonban azon folyamatok molekuláris hátteréről, amelyek a gyulladási folyamatokban kialakult kontraktilis válaszokat csökkentik és relaxációt indukálnak.

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a CN-nak fontos szerepe van a trombin-indukált endotél diszfunkció helyreállításában, azaz az aktin-citoszkeleton nem stimulált sejtekre jellemző szerkezeti visszarendeződésében. Erre utaló adatokat a CN farmakológiai inhibitorainak (CsA, FK506) az alkalmazásával és a CNA alegység aktív formájának BPAEC-ben történő overexpressziójával kaptunk. A trombin kezelés az EC 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, amely azonban a CN gátlószerek (CsA és FK506) jelenlétében jelentősen mérsékelt. Ezek az adatok egyértelműen bizonyították, 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-ciszkeleton visszarendeződését BPAEC-ben.

Egy másik kísérletsorozatunkkal a CNA izoformaspecifikus hatását kívántuk tisztázni BPAEC-ben. A CN heterodimer, amely CNA és CNB alegységekből áll. Kevés információ áll rendelkezésünkre a CN katalitikus alegység (CNA) különböző izoformáinak (CNA α , CNA β , CNA γ) funkcionális különbségeire vonatkozóan. Az ismert, hogy a három emlős CNA izoforma leginkább az N- és C-terminális peptidszakaszaiban különböznek egymástól, de az egyes izoformák funkciója nem tisztázott, annak ellenére, hogy a szekvenciában mutatózó különbségeknek fontos szerepe lehet a CN szabályozásában (Gooch, 2006 és Perrino és mtsai., 2002). A különböző CNA izoformák overexpressziója azonban sem a kezeletlen, sem a trombin-kezelt sejtekben nem befolyásolta az EC aktin-citoszkeleton szerkezetét. Ez arra utal, hogy a CNA alegység önmagában történő overexpressziója nem növeli a sejtek CN

aktivitását, feltehetően azért, mert a CN heterodimer (CNA és CNB) szerkezete alapvetően fontos a CN katalitikus funkciójában (Klee és mtsai, 1998), és a CNA overexpressziója nem indukálja a CNB expresszióját. Ezzel szemben az aktív, rövidített CNA izoforma (Δ CNA-pEGFP) transzfekciója viszont hatékonyan csökkentette a trombin-indukált stressz-kábelek mennyiségét BPAEC-ben, megerősítve a CN feltételezett szerepét a barrier diszfunkció megszüntetésében. A fenti adatok alapján tehát egyértelmű bizonyítékot nyertünk arra nézve, hogy a CN részt vesz az EC barrier funkció szabályozásában, azonban e mechanizmus molekuláris hátterének feltárása további kísérleteket igényelt.

A CN szerepe a barrier diszfunkció szabályozásában a MP MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek defoszforilációjával

Irodalmi adatokból ismert, hogy a CN-nak fontos szerepe van a MLC20 foszforilációjának szabályozásában, annak ellenére, hogy közvetlenül nem vesz részt a miozin e formájának defoszforilációjában (Takizawa és mtsai., 2002a). Vizsgálatainkban a CN közvetett szerepét feltételeztük a MP szabályozásán keresztül, elsősorban a MYPT1 regulátor alegység gátló foszforilációs helyeinek (Thr696 és Thr853) defoszforilációjával. Kísérleteink első részében bizonyítottuk, hogy a kezeletlen EC-ben a CN alapaktivitásának gátlása CsA-val és FK506-tal szignifikánsan növelte a MYPT1^{pThr696} és anti-MYPT1^{pThr853} oldalláncok foszforilációját. A CsA a CN hatékonyabb gátlószerének bizonyult, mint az FK506, mivel jelenlétében a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének emelkedése nagyobb mértékű volt BPAEC-ben és HPAEC-ben is. A ROK inhibitor (H1152) önmagában és CsA előkezeléssel alkalmazva is csökkentette a MYPT1^{pThr696} és a MYPT1^{pThr853} foszforilációs szintjét, amely a folyamat ROK-függő jellegére utal. *In vitro* foszfatáz aktivitásmérések tisztított enzimekkel 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 rövidített CN-nal is bekövetkezik. Mindezek az adatok azzal a következtetéssel vannak összhangban, hogy a CN a MYPT1 Ca^{2+} /CaM-függő foszfatáza. Ezzel szemben korábban kétségbe vonták a CN e szerepét, mivel simaizom sejtek lizátumából Ca^{2+} /CaM-függő MYPT1 defoszforilációt nem mutattak ki (Takizawa és mtsai, 2002b). Eredményeink azonban egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a CN a MYPT1 egyik foszfatáza fiziológiai körülmények mellett is EC-ben és tsA201 sejtekben is, és ez a felismerés a CN EC-ben kifejtett szabályozó mechanizmusának molekuláris megismeréséhez is fontos lépést jelentett.

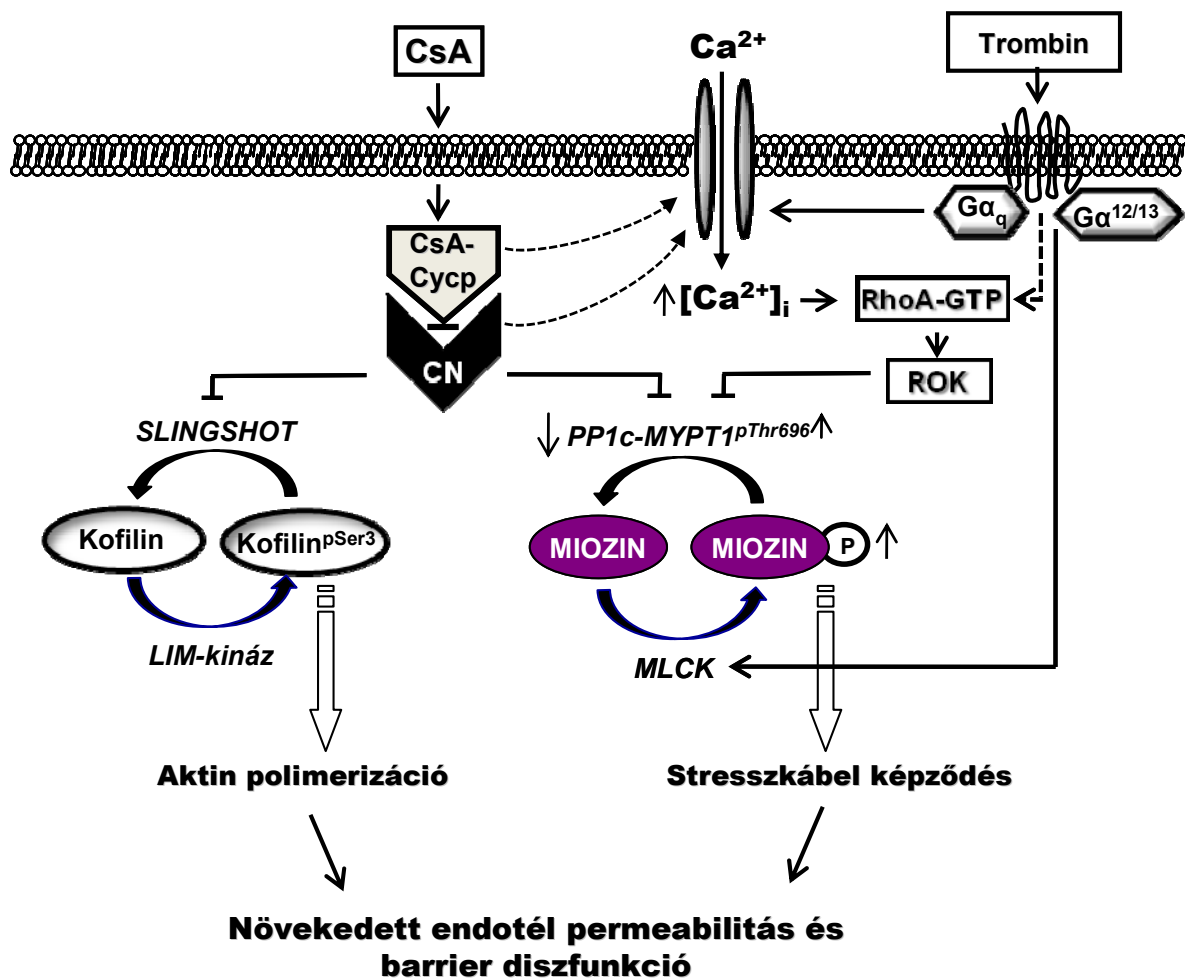
Az eddig ismertett támogató adatok ellenére is felmerül azonban a kérdés, hogy hogyan vezethet a CN gátlása BPAEC-ben, vélhetően alacsony $[Ca^{2+}]_i$ szint és CN aktivitás mellett a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének nagymértékű emelkedéshez. Ezért tanulmányoztuk a CsA hatását az $[Ca^{2+}]_i$ tranziensekre és nagy meglepetésünkre azt találtuk, hogy a CsA növeli a $[Ca^{2+}]_i$ -t, amelynek előfeltétele az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte. Ez utóbbi arra utal, hogy a $[Ca^{2+}]_i$ növekedés a BPAEC valamelyik plazmamembrán Ca^{2+} -csatornáján keresztül valósul meg. E csatornatípus azonosítását és a mechanizmus feltárását, nevezetesen, hogy a Ca^{2+} beáramlás a CsA-ciklofillin komplex csatornára gyakorolt közvetlen, vagy CN-re gyakorolt gátló hatásával kapcsolatos-e, további kísérletekben kell tisztázni. Kimutattuk, hogy a CsA-indukált tranziens $[Ca^{2+}]_i$ növekedés előfeltétele a MYPT1^{pThr696} foszforiláció emelkedésének, mivel extracelluláris Ca^{2+} hiányában (EGTA hozzáadásával) a MYPT1^{pThr696} szintjének CsA-indukált növekedése elmaradt. Ismert, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése a RhoA-t aktiválja (Singh és mtsai., 2007), és ezzel a ROK aktivitását is növeli, amely a MYPT1^{pThr696} foszforilációs szintjének emelkedését okozza. Ugyanakkor eredményeink azt is sugallják, hogy a CsA-indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés nem aktiválja a MLCK-t olyan mértékben, amely szignifikánsan növelné a MLC20^{pSer19} szintjét. Másrészt, a kofilin^{Ser3} (aktin depolimerizáló faktor) foszforilációja jelentősen emelkedett CsA kezelés után a BPAEC-ben és HPAEC-ben is. Korábbi tanulmányok beszámoltak arról, hogy az emelkedett $[Ca^{2+}]_i$ a CN aktivációjával párosul, melyet összefüggésbe hoztak a kofilin^{pSer3} defoszforilációját katalizáló Slingshot foszfatáz aktivációjával HeLa sejtekben (Wang és mtsai., 2005). Leírták azt is, hogy a Slingshot foszfatáz defoszforilációját és aktivációját a CN végzi, és ez által a kofilin^{pSer3} szintjének a csökkenését eredményezi. Az $[Ca^{2+}]_i$ CsA által indukált növekedése a LIMK (kofilin kináz) aktivációjával is párosul (feltehetően a RhoA/ROK aktiválásával), hozzájárulva a kofilin^{pSer3} szintjének növekedéséhez. Ez a kofilin^{pSer3} emelkedés tovább fokozódik CsA által a CN gátlásával megakadályozva a Slingshot aktiválását. A kofilin^{pSer3} aktint depolimerizáló aktivitása gátolt, és ez az F-aktin mennyiségében növekedést és a citoszkeleton aktin szerkezetének átrendeződését vonja maga után.

A MYPT1^{pThr696} szintje kulcsfontosságú a MP aktivitásának és ezzel együtt a MLC20 foszforiláltsági állapotának szabályozásában. Verin és mtsai kimutatták a CN asszociációját az EC citoszkeletális (miozin gazdag) frakciójával és az aktinnal, valamint a MLC20-al való kolokalizációját is (Verin és mtsai, 1998). Leírták, hogy a trombin kezelés növeli a CN aktivitást, ami a citoszkeletális fehérjék (köztük a MLC20) fokozott defoszforilációjában is

megnyilvánult BPAEC-ben. Ezzel szemben, a CN inhibitorok alkalmazásával az EC fehérjéinek defoszforilációja, beleértve a MLC20^{pSer19}-et is, gátolt volt. Jelen eredményeink alátámasztják egy olyan mechanizmus működését, 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 (Essler és mtsai, 1999). Jelen adataink azt igazolják, hogy az átmeneti MP gátlás tranziens MYPT1^{pThr696} emelkedéssel párosul és a MYPT1^{pThr696} defoszforilációjában a CN-nak fontos szerepe van. CsA jelenlétében történő trombin kezelése mellett ugyanis a MYPT1^{pThr696} szintje részben fenntartott marad, ami egyben fokozott MLC20^{pSer19} foszforilációt is eredményez. 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, amellyel jelen *in vitro* foszfatáz aktivitás mérési 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. Mindazonáltal a PP2A-t már összefüggésbe hozták a MYPT1 defoszforilációjával, mivel kimutatták, hogy a PP2A gátlása sejt-permeabilis foszfatázgátló toxinokkal (OA vagy CLA) jelentősen növelte mind, a MYPT1^{pThr696}, mind a MYPT1^{pThr853} oldalláncok foszforilációját THP-1 és HepG2 sejtekben (Kiss és mtsai, 2008 és Lontay és mtsai, 2005). Feltételezzük, hogy ezeknek a „CsA-inszenzitív” PP2A (és PP1) enzimeknek is szerepük lehet az EC CsA-val és trombinnal történő együttes kezelése során a MYPT1^{pThr696} részleges csökkenésében és ezzel egyidejűleg a MLC20^{pSer19} szintjének változásában.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a CN gátlószerek (CsA, FK506, deltametrin) befolyásolják az EC permeabilitását. Lum és mtsai 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 (Lum és mtsai, 2001). Az FK506 hatását azzal magyarázták, hogy a CN gátlásával a PKC α foszforilációja emelkedett. Ismert az is, hogy CN gátlása deltametrinnel szintén emelte az EC permeabilitást és ez a MLC20 fokozott foszforilációjával párosult (Verin és mtsai, 1998). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a CN gátlása CsA-val csökkenti

a TER-t BPAEC-ben, azonban szignifikáns változást a MLC20 foszforilációs szintjében nem detektáltunk. Feltételezésünk szerint ez a CsA okozta TER változás a kofilin^{pSer3} szintjének változásával függ össze, ugyanis a CsA kezelés hatására emelkedett a kofilin^{pSer3}, ami fokozott aktin polimerizációhoz, ezáltal az EC permeabilitásának növekedéséhez vezethet. CsA előkezelés trombin hozzáadását megelőzően jelentősen lassítja a TER értékének kontroll szintre történő visszatérését, azaz a barrier funkció helyreállítását BPAEC-ben, amit feltehetően e hatással párhuzamosan megfigyelhető fenntartott MYPT1^{pThr696} és MLC20^{pSer19} foszforilációs szint okozhat. Eredményeink tehát azzal a következtetéssel vannak összhangban, amelyek szerint a CN gátlása CsA-val hatással van mind a MLCK-függő, mind pedig MLCK-független jelátviteli útvonalakra is EC-ben (24. ábra).



24. ábra. Jelátviteli útvonalak, amelyek a CsA által történő endotél permeabilitás változását idézhetik elő endotél sejtekben.

SPR kötődési kísérleteket végezve kimutattuk, hogy a CN és a defoszforilált MYPT1 között stabil kölcsönhatás van, amely azt jelzi, hogy a két fehérje között nemcsak egyszerű enzim-szubsztrát jellegű kapcsolat alakulhat ki. MYPT1 fragmentumokkal végzett kötődési

kísérletek azt igazolták, hogy a MYPT1 N-termiális régiójának van nagy szerepe a CN-nal való kölcsönhatásban, amit az is megerősít, hogy a CN szubsztrát-kötő PxIXIT szekvencia motívuma (Roy és mtsai., 2009) megtalálható a MYPT1 N-terminális régiójában (³⁰⁰PLIEST³⁰⁵), amelynek általában fontos szerepe van a CN-hez való kötődésben. Ezzel összhangban azok a MYPT1 fragmentumok, amelyekből hiányzik ez a motívum (MYPT1¹⁻²⁹⁶ és MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹) kisebb affinitással kötődnek ($K_a \sim 10^4-10^5$) a CN-hez, mint a PIXIT-szerű motívumot is tartalmazó hosszabb N-terminális (MYPT1¹⁻⁶³³) vagy a teljes hosszúságú (MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴) fehérjék ($K_a \sim 10^7$). Mindazonáltal a MYPT1¹⁻²⁹⁶ és a MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ fragmentek is szignifikáns kötődéseket mutatnak a CN-nal, ami arra utal, hogy a PxIXIT motívumot nem tartalmazó régiók is részt vesznek a stabil CN-MYPT1 komplex kialakításában. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a PP1c is kötődik a MYPT1 N-termiális régiójához (Toth és mtsai, 2000b) és a PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban elsődleges fontosságú a MYPT1³⁵KVKF³⁸ kötőmotívuma, amely szekvenciájában és lokalizációjában is eltér a ³⁰⁰PLIEST³⁰⁵ kötőhelytől. Egyfajta versengés a kötőhelyekért a PP1c és a CN között kizárható, mivel a pull-down kísérleteink során a CN és a PP1cδ Flag-MYPT1-el történő fokozott, együttes precipitációját detektáltuk, valamint SPR kísérletekkel is bizonyítottuk, hogy a CN azonos affinitással kötődik a MYPT1-hez és a MYPT1-PP1c komplexhez. Összefoglalva: munkánk során a CN-t a MYPT1 Thr696 és Thr853 gátló foszforilációs helyeinek defoszforilációjában részt vevő foszfatázként azonosítottuk. Marha és humán tüdő artéria endotél sejtekben kimutattuk, hogy a CN-nak fontos szerepe van a MP trombin kezelés következtében kialakuló tranziens gátlás utáni aktivációjában a MP MYPT1 alegységén lévő gátló helyek (Thr696 és Thr853) defoszforilációjával. A CN defoszforilált MYPT1-gyel (és fragmentumaival) kialakuló komplexe meglehetősen stabil, ami arra utal, hogy ezen fehérjék kölcsönhatásának az egyszerű enzim-szubsztrát kölcsönhatáson kívül más biológiai funkciója is lehet, így pl. a kölcsönhatás elősegítheti ezen fehérjék kolokalizációját fiziológiai szempontból fontos szignalizációs komplexekben. Eredményeink arra utalnak, hogy a CN-nak fontos szerepe van a trombin-indukált endotél diszfunkció helyreállításában, a MP szabályozásán keresztül a MYPT1 és ezzel a MLC20 defoszforilációja által.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az aktin-citoszkeleton, ezen belül az aktin-miozin kölcsönhatás szerkezeti változásai az endothel sejtek alakjának és barrier funkciójának fontos tényezője. Gyulladásos folyamatokban, pl. trombin hatására, az endotél sejtek kontrakciója következik be, a sejtek között rések jönnek létre, a barrier funkció sérül. A kontrakció hátterében a miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja áll, amelynek foszforilációját a MLC-kináz (MLCK), míg defoszforilációját a protein foszfatáz-1 (PP1) típusú miozin foszfatáz (MP) katalizálja. A MP holoenzimben található MYPT1 regulátor alegység a PP1 katalitikus alegység (PP1c) szubsztrátspecificitását és aktivitását is szabályozza, mivel a MYPT1 Rho-kináz (ROK) által történő foszforilációja a Thr696 és Thr853 oldalláncokon gátolja a PP1c aktivitást. A foszfo-MYPT1 defoszforilációjának mechanizmusa azonban, különösen endotél sejtekben, nem ismert. Tanulmányoztuk a Ca^{2+} /CaM-függő Ser/Thr specifikus protein foszfatáz (CN vagy PP2B), szerepét humán és emlős endotél sejtek (BPAEC és HPAEC) aktin-citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, ill. a MYPT1 MP gátlást okozó foszforilációs helyeinek defoszforilációjában.

Kimutattuk, hogy a CN gátlószer CsA jelenlétében a trombin hatására az EC-k között kialakuló rések hosszabb ideig megmaradnak, míg ezzel szemben a konstitutív aktív CN (Δ CNA-pEGFP) overexpressziója elősegíti a trombin-indukált stressz-kábelek mennyiségének csökkenését BPAEC-ben. CsA kezelést követően növekedett az intracelluláris Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) szintje, valamint a kofilin^{Ser3} és a MYPT1^{Thr696} foszforilációja $[Ca^{2+}]_i$ és ROK-függő módon. A tisztított CN defoszforilálta a ³²P-MYPT1-et, valamint az aktív CN fragmentum overexpressziója az endogén MYPT1^{pThr696} szintjének csökkenését okozta tsA201 sejtekben, a CN közvetlen szerepére utalva a foszfo-MYPT1 defoszforilációjában. BPAEC CsA-val és trombinnal történő kezelése részlegesen fenntartott MYPT^{pThr696} és MLC20^{pSer19} szintet, valamint hosszabb ideig fennmaradó trombin-indukált transzendotéliális ellenállás csökkenést (EC diszfunkciót) eredményezett. Igazoltuk a CN és a MYPT1 kölcsönhatását BPAEC- és HPAEC-ben, valamint *in vitro* kötődési módszerekkel feltártuk a kölcsönhatás szerkezeti hátterét is. A CN kötődése a teljes és rövidített rekombináns MYPT1 fragmentumokhoz arra utalt, hogy a CN a MYPT1 N-terminális régiójához kötődik, amelyben megtalálható a CN szubsztrátkötő PIXIT-szerű szekvencia (³⁰⁰PLIEST³⁰⁵) motívum is. Összefoglalva: a CN-t a MP aktivitását szabályozó enzimeként azonosítottuk és kimutattuk szerepét az EC barrier integritás szabályozásában. A stabil CN-MYPT1 komplex kialakulása azt sejteti, hogy ezen enzimek kölcsönhatásának további fiziológiai funkciói is lehetségesek.

SUMMARY

Changes in actin-cytoskeleton and in the actin-myosin interaction are important determinants of the shape and barrier function of endothelial cells (EC). Inflammation (evoked by thrombin for example) causes contraction of EC, which results in intercellular gap formation and barrier dysfunction. Contraction of the cells is induced by the phosphorylation of the 20 kDa light chain of myosin (MLC20), which is phosphorylated by the MLC kinase (MLCK), while the dephosphorylation is catalyzed by myosin phosphatase (MP), a protein phosphatase-1 (PP1) holoenzyme. The myosin phosphatase targeting subunit (MYPT1) binds to and regulates the substrate specificity and activity of PP1 catalytic subunit (PP1c), since its phosphorylation on the Thr696 and Thr853 side chains by Rho-kinase (ROK) causes the inhibition of PP1c. On the other hand, mechanism of dephosphorylation of phospho-MYPT1, especially in EC, is not known yet. We studied the role of the Ca^{2+} /CaM-dependent Ser/Thr-specific protein phosphatase (CN, or also known as PP2B) in the regulation of the actin-cytoskeleton structure of human and bovine EC (HPAEC and BPAEC) and its involvement in the dephosphorylation of phospho-MYPT1 at the MP inhibitory sites.

We observed that CsA, an inhibitor of CN, prolongs the recovery of EC from thrombin-induced gap formation, whereas overexpression of a constitutively active CNA ($\Delta\text{CNA-pEGFP}$) resulted in reduced thrombin-induced stress fiber formation in BPAEC. CsA treatment induced a rise in intracellular Ca^{2+} level and increased the phosphorylation level of cofilin^{Ser3} and MYPT1^{Thr696} in a Ca^{2+} - and ROK-dependent manner. Purified CN dephosphorylated the ³²P-labeled MYPT1, while the overexpression of an active catalytic fragment of CN in tsA201 cells decreased the amount of endogenous MYPT1^{pThr696} suggesting a direct role of CN in the dephosphorylation of phospho-MYPT1. Treatment of BPAEC with CsA before the addition of thrombin resulted in partially maintained phosphorylation level of both MYPT1^{pThr696} and MLC20^{pSer19}, and slowed down the recovery of transendothelial electrical resistance from the thrombin induced decrease. Interaction of MYPT1 with CN was verified in both BPAEC and HPAEC. Structural analysis of the interaction revealed binding of CN to the full-length and truncated mutants of MYPT1 with CN binding sites localized at the N-terminal half of MYPT1 in accordance with the presence of a putative CN-binding PxIxIT motif (³⁰⁰PLIEST³⁰⁵) in MYPT1. In summary, we identified the role CN in the regulation of myosin phosphatase activity and the control of EC barrier integrity. Formation of a stable CN-MYPT1 complex suggests that the interaction of the two enzymes may have broader physiological significance.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. and Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, **210**, 1023-1035.
- Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C. and Samstag, Y. (2000). The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **30**, 3422-3431.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Hollinger, L.A., Wolpert, E.B. and Gardner, T.W. (1999). Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem*, **274**, 23463-23467.
- Aramburu, J., Rao, A. and Klee, C.B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul*, **36**, 237-295.
- Birukova, A.A., Liu, F., Garcia, J.G. and Verin, A.D. (2004). Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **287**, L86-93.
- Biswas, P., Canosa, S., Schoenfeld, D., Schoenfeld, J., Li, P., Cheas, L.C., *et al.* (2006). PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation. *Am J Pathol*, **169**, 314-324.
- Bogatcheva, N.V., Garcia, J.G. and Verin, A.D. (2002). Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)*, **67**, 75-84.
- Bogumil, R., Namgaladze, D., Schaarschmidt, D., Schmachtel, T., Hellstern, S., Mutzel, R. and Ullrich, V. (2000). Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *Eur J Biochem*, **267**, 1407-1415.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. and Stahelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, **6**, 468-475.
- Borman, M.A., MacDonald, J.A., Muranyi, A., Hartshorne, D.J. and Haystead, T.A. (2002). Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca²⁺ sensitization via myosin phosphatase inhibition. *J Biol Chem*, **277**, 23441-23446.
- Broustas, C.G., Grammatikakis, N., Eto, M., Dent, P., Brautigan, D.L. and Kasid, U. (2002). Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, **277**, 3053-3059.
- Cao, W., Mattagajasingh, S.N., Xu, H., Kim, K., Fierlbeck, W., Deng, J., *et al.* (2002). TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C327-337.
- Chang, A.N., Chen, G., Gerard, R.D., Kamm, K.E. and Stull, J.T. (2010). Cardiac myosin is a substrate for zipper-interacting protein kinase (ZIPK). *J Biol Chem*, **285**, 5122-5126.

- Chang, C.D., Mukai, H., Kuno, T. and Tanaka, C. (1994). cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B alpha 2). *Biochim Biophys Acta*, **1217**, 174-180.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, **58**, 453-508.
- Cohen, P. (2002a). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*, **4**, E127-130.
- Cohen, P. (2002b). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 309-315.
- Cohen, P., Foulkes, J.G., Holmes, C.F., Nimmo, G.A. and Tonks, N.K. (1988). Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*, **159**, 427-437.
- Cohen, P.T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, **22**, 245-251.
- Cohen, P.T. (2002c). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
- Csortos, C., Kolosova, I. and Verin, A.D. (2007). Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **293**, L843-854.
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 261-270.
- Deng, J.T., Sutherland, C., Brautigan, D.L., Eto, M. and Walsh, M.P. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*, **367**, 517-524.
- Dudek, S.M. and Garcia, J.G. (2001). Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, **91**, 1487-1500.
- Ehringer, W.D., Yamany, S., Steier, K., Farag, A., Roisen, F.J., Dozier, A. and Miller, F.N. (1999). Quantitative image analysis of F-actin in endothelial cells. *Microcirculation*, **6**, 291-303.
- Ermert, L., Bruckner, H., Walmrath, D., Grimminger, F., Aktories, K., Suttorp, N., *et al.* (1995). Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol*, **268**, L753-761.
- Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J.W., Aepfelbacher, M. and Siess, W. (1999). Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, **274**, 30361-30364.

- Eto, M. (2009). Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem*, **284**, 35273-35277.
- Eto, M., Kitazawa, T. and Brautigan, D.L. (2004). Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8888-8893.
- Eto, M., Senba, S., Morita, F. and Yazawa, M. (1997). Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett*, **410**, 356-360.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J. and Nakano, T. (1999a). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **274**, 37385-37390.
- Feng, J., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., *et al.* (1999b). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, **274**, 3744-3752.
- Fujioka, M., Takahashi, N., Odai, H., Araki, S., Ichikawa, K., Feng, J., *et al.* (1998). A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, **49**, 59-68.
- Garcia, J.G., Davis, H.W. and Patterson, C.E. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, **163**, 510-522.
- Garcia, J.G., Lazar, V., Gilbert-McClain, L.I., Gallagher, P.J. and Verin, A.D. (1997). Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **16**, 489-494.
- Garcia, J.G., Verin, A.D., Schaphorst, K., Siddiqui, R., Patterson, C.E., Csontos, C. and Natarajan, V. (1999). Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src). *Am J Physiol*, **276**, L989-998.
- Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P. and Wysolmerski, R.B. (2000). Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem*, **275**, 18366-18374.
- Goeckeler, Z.M. and Wysolmerski, R.B. (2005). Myosin phosphatase and cofilin mediate cAMP/cAMP-dependent protein kinase-induced decline in endothelial cell isometric tension and myosin II regulatory light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, **280**, 33083-33095.
- Gooch, J.L. (2006). An emerging role for calcineurin Aalpha in the development and function of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**, F769-776.
- Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. (1987). Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*, **5**, 4-8.

Guerini, D. and Klee, C.B. (1989). Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9183-9187.

Hartshorne, D.J., Ito, M. and Erdodi, F. (2004). Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **279**, 37211-37214.

Hashimoto, Y. and Soderling, T.R. (1989). Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *J Biol Chem*, **264**, 16524-16529.

Hirano, K., Phan, B.C. and Hartshorne, D.J. (1997). Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 3683-3688.

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

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, **80**, 225-236.

Ichikawa, K., Ito, M. and Hartshorne, D.J. (1996). Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, **271**, 4733-4740.

Ingebritsen, T.S. and Cohen, P. (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem*, **132**, 255-261.

Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. and Hartshorne, D.J. (2004). Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, **259**, 197-209.

Jin, L., Roehrl, M.H., Xiao, L., He, X., Li, H., Ge, L. and Shi, B. Crystallization and preliminary crystallographic study of a trypsin-resistant catalytic domain of human calcineurin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 574-579.

Kakalis, L.T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F. and Armitage, I.M. (1995). Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Lett*, **362**, 55-58.

Ke, H. and Huai, Q. (2003). Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 1095-1102.

Kiss, A., Becsi, B., Kolozsvari, B., Komaromi, I., Kover, K.E. and Erdodi, F. Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-d-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS J*.

Kiss, A., Lontay, B., Becsi, B., Markasz, L., Olah, E., Gergely, P. and Erdodi, F. (2008). Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal*, **20**, 2059-2070.

- Kiss, E., Muranyi, A., Csontos, C., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D.J. and Erdodi, F. (2002). Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J*, **365**, 79-87.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., *et al.* (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*, **378**, 641-644.
- Klee, C.B., Draetta, G.F. and Hubbard, M.J. (1988). Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **61**, 149-200.
- Klee, C.B., Ren, H. and Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem*, **273**, 13367-13370.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P. and Cheresch, D.A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*, **137**, 481-492.
- Kobayashi, N., Reiser, J., Schwarz, K., Sakai, T., Kriz, W. and Mundel, P. (2001). Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem Cell Biol*, **115**, 255-266.
- Kolosova, I.A., Ma, S.F., Adyshev, D.M., Wang, P., Ohba, M., Natarajan, V., *et al.* (2004). Role of CPI-17 in the regulation of endothelial cytoskeleton. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **287**, L970-980.
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., *et al.* (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett*, **475**, 197-200.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, M.M., Burnett, P.E., Wolosker, H., Blackshaw, S. and Snyder, S.H. (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem*, **273**, 18325-18331.
- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, **66**, 807-815.
- Liu, J., Masuda, E.S., Tsuruta, L., Arai, N. and Arai, K. (1999). Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. *J Immunol*, **162**, 4755-4761.
- Liu, J.O. (2003). Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 1103-1109.
- Lontay, B., Kiss, A., Gergely, P., Hartshorne, D.J. and Erdodi, F. (2005). Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1

influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal*, **17**, 1265-1275.

Lontay, B., Serfozo, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D.J. and Erdodi, F. (2004). Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol*, **478**, 72-87.

Lum, H., Podolski, J.L., Gurnack, M.E., Schulz, I.T., Huang, F. and Holian, O. (2001). Protein phosphatase 2B inhibitor potentiates endothelial PKC activity and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **281**, L546-555.

MacDonald, J.A., Eto, M., Borman, M.A., Brautigan, D.L. and Haystead, T.A. (2001). Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett*, **493**, 91-94.

Mansfield, P.J., Shayman, J.A. and Boxer, L.A. (2000). Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. *Blood*, **95**, 2407-2412.

Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M. and Bamburg, J.R. (1998). Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton*, **39**, 172-190.

Mehta, D. and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, **86**, 279-367.

Muramatsu, T. and Kincaid, R.L. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem Biophys Res Commun*, **188**, 265-271.

Muranyi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M. and Hartshorne, D.J. (2005). Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett*, **579**, 6611-6615.

Muranyi, A., Erdodi, F., Ito, M., Gergely, P. and Hartshorne, D.J. (1998). Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem J*, **330** (Pt 1), 225-231.

Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H.F. and Hartshorne, D.J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett*, **493**, 80-84.

Musson, R.E. and Smit, N.P. Regulatory mechanisms of calcineurin phosphatase activity. *Curr Med Chem* **18**, 301-315.

Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., *et al.* (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, **11**, 671-676.

- Nakamura, Y., Hashimoto, R., Amano, M., Nagata, K., Matsumoto, N., Goto, H., *et al.* (2000). Localized phosphorylation of vimentin by rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells*, **5**, 823-837.
- Niiro, N. and Ikebe, M. (2001). Zipper-interacting protein kinase induces Ca (2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, **276**, 29567-29574.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, **108**, 233-246.
- O'Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J. and O'Neill, E.A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*, **357**, 692-694.
- Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., *et al.* (2003). Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells*, **8**, 811-824.
- Patterson, C.E., Lum, H., Schaphorst, K.L., Verin, A.D. and Garcia, J.G. (2000). Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium*, **7**, 287-308.
- Perrino, B.A., Wilson, A.J., Ellison, P. and Clapp, L.H. (2002). Substrate selectivity and sensitivity to inhibition by FK506 and cyclosporin A of calcineurin heterodimers composed of the alpha or beta catalytic subunit. *Eur J Biochem*, **269**, 3540-3548.
- Potter, M.D., Barbero, S. and Cheresch, D.A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem*, **280**, 31906-31912.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **274**, 36734-36740.
- Roy, J. and Cyert, M.S. (2009). Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal*, **2**, re9.
- Rumi-Masante, J., Rusinga, F.I., Lester, T.E., Dunlap, T.B., Williams, T.D., Dunker, A.K., *et al.* Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin. *J Mol Biol* **415**, 307-317.
- Rusnak, F. and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*, **80**, 1483-1521.

- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. and Tsukita, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*, **137**, 1393-1401.
- Schaphorst, K.L., Pavalko, F.M., Patterson, C.E. and Garcia, J.G. (1997). Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **17**, 443-455.
- Serres, M., Grangeasse, C., Haftek, M., Durocher, Y., Duclos, B. and Schmitt, D. (1997). Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells. *Exp Cell Res*, **231**, 163-172.
- Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., *et al.* (1994). Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **269**, 30407-30411.
- Singer, K.L., Stevenson, B.R., Woo, P.L. and Firestone, G.L. (1994). Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, **269**, 16108-16115.
- Singh, I., Knezevic, N., Ahmmed, G.U., Kini, V., Malik, A.B. and Mehta, D. (2007). Galphaq-TRPC6-mediated Ca²⁺ entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem*, **282**, 7833-7843.
- Skinner, J.A. and Saltiel, A.R. (2001). Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **356**, 257-267.
- Stasek, J.E., Jr., Patterson, C.E. and Garcia, J.G. (1992). Protein kinase C phosphorylates caldesmon⁷⁷ and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Cell Physiol*, **153**, 62-75.
- Stewart, A.A., Ingebritsen, T.S., Manalan, A., Klee, C.B. and Cohen, P. (1982). Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Lett*, **137**, 80-84.
- Takizawa, N., Koga, Y. and Ikebe, M. (2002a). Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 773-778.
- Takizawa, N., Niuro, N. and Ikebe, M. (2002b). Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. *FEBS Lett*, **515**, 127-132.
- Tallant, E.A., Wallace, R.W. and Cheung, W.Y. (1983). Purification and radioimmunoassay of calmodulin-dependent protein phosphatase from bovine brain. *Methods Enzymol*, **102**, 244-256.

- Tan, I., Ng, C.H., Lim, L. and Leung, T. (2001). Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **276**, 21209-21216.
- Toth, A., Kiss, E., Gergely, P., Walsh, M.P., Hartshorne, D.J. and Erdodi, F. (2000a). Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Lett*, **484**, 113-117.
- Toth, A., Kiss, E., Herberg, F.W., Gergely, P., Hartshorne, D.J. and Erdodi, F. (2000b). Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem*, **267**, 1687-1697.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y. and Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, **150**, 797-806.
- Ueki, K., Muramatsu, T. and Kincaid, R.L. (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun*, **187**, 537-543.
- van Nieuw Amerongen, G.P., Musters, R.J., Eringa, E.C., Sipkema, P. and van Hinsbergh, V.W. (2008). Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C1234-1241.
- Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S. and Cohen, P. (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett*, **527**, 101-104.
- Verin, A.D., Cooke, C., Herenyiova, M., Patterson, C.E. and Garcia, J.G. (1998). Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile responses. *Am J Physiol*, **275**, L788-799.
- Wang, X., Culotta, V.C. and Klee, C.B. (1996). Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, **383**, 434-437.
- Wang, Y., Shibasaki, F. and Mizuno, K. (2005). Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem*, **280**, 12683-12689.
- Wong, E.Y., Morgan, L., Smales, C., Lang, P., Gubby, S.E. and Staddon, J.M. (2000). Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells. *Biochem J*, **346** Pt 1, 209-216.
- Wong, M.K. and Gotlieb, A.I. (1990). Endothelial monolayer integrity. Perturbation of F-actin filaments and the dense peripheral band-vinculin network. *Arteriosclerosis*, **10**, 76-84.

Wooldridge, A.A., MacDonald, J.A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A., Hartshorne, D.J. and Haystead, T.A. (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, **279**, 34496-34504.

Wysolmerski, R.B. and Lagunoff, D. (1990). Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 16-20.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., *et al.* (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, **393**, 809-812.

TÁRGYSZAVAK

Endotél barrier funkció

Kalcineurin (Protein foszfatáz-2B)

Kalcineurin katalitikus alegység izoformák

Stressz-kábel

Miozin foszfatáz

Miozin foszfatáz regulátor alegység 1 (MYPT1)

Transzendotél ellenállásmérés

Immunfluoreszcencia

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bakó Évának, aki útmutatásával, hasznos tanácsaival irányította Ph.D munkámat az évek során.

Köszönettel tartozom Gergely Pál professzor úrnak, aki mind munkacsoportvezetőként, mind intézetigazgatóként ösztönözte munkámat és biztosította számomra a megfelelő kutatási feltételeket, illetve hasznos tanácsokkal és útmutatásokkal irányította szakmai tevékenységemet.

Különösen szeretném megköszönni Erdődi Ferenc professzor úrnak az ötleteket, támogatást és iránymutatást, amit kaptam tőle az elmúlt évek során.

Köszönöm jelenlegi intézetvezetőnknek, Virág László professzor úrnak, hogy támogatta munkámat.

Az Orvosi Vegytani Intézetben számos munkatársam segítette mindennapi munkámat, akiket szintén köszönet illet. Módszertani szempontból feltétlenül ki kell emelnem közülük Dembrovszkiné Kovács Ella asszisztent, aki önzetlen segítségével és kitartásával támogatott minden kísérlet megvalósításában. Szeretném megköszönni Dr. Csontos Csillának a sok segítséget és tanácsot, amelyeket az évek során kaptam tőle.

Köszönöm Dr. Kiss Andreának, Dr. Lontay Beátának és Dr. Sziogyártó Zsoltnak, akik kollégaként és barátként is sokat tettek azért, hogy hasznos tanácsok mellett, vidám légkörben teljenek az elmúlt évek.

A kutatások során kollaborációs partnereink részéről szeretném megköszönni Dr. Vámosi Györgynek, a konfokális mikroszkóp használatában, Dr. Tóth Attilának és Czikora Ágnesnek a Ca^{2+} mérések kivitelezésében nyújtott segítségét valamint minden szerzőtársamnak köszönöm a kutatási projectekben végzett munkájukat.

Hálás köszönet illeti Szüleimet és azokat a barátaimat, akik a sokszor nehéz hétköznapiakban is mindvégig mellettem álltak.

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.



SZÉCHENYI TERV

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 citoskeletonjának 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 calcineurin szerepe a miozin foszfatáz 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 calcineurin szerepe az endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, 38. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2008

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

Kolozsvári Bernadett, Bakó Éva, Gergely Pál: A PP2B/calcineurin 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

Kolozsvári Bernadett, Bakó Éva, Mótyán János, Gergely Pál: Calcineurin szerepe endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Pécs, 2006