

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ INTEGRINEKHEZ KAPCSOLÓDÓ KINÁZ
SZEREPE A MIOZIN FOSZFATÁZ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

KISS ENIKŐ

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2003**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
<i>Protein foszfatáz-1 holoenzimek: szerkezet, szabályozás</i>	<i>6</i>
Protein foszfatáz-1 katalitikus alegység	6
PP1c regulátor alegységek.....	7
<i>A miozin foszfatáz alegységszerkezete.....</i>	<i>9</i>
<i>A miozin foszforiláció szerepe a simaizom összehúzódásban.....</i>	<i>10</i>
<i>A miozin foszfatáz szabályozása.....</i>	<i>13</i>
A miozin foszfatáz szabályozása MYPT1 foszforilációjával	13
A miozin foszfatáz szabályozása a CPI-17 inhibitor fehérje foszforilációjával	15
A miozin foszfatáz lokalizációjának szerepe a foszfatáz aktivitás szabályozásában	15
A miozin foszfatáz szabályozásában résztvevő foszfofehérjék defoszforilációja	15
A miozin foszfatáz szabályozása trombocitákban	16
CÉLKITŰZÉS	17
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
<i>Anyagok.....</i>	<i>18</i>
<i>Fehérjetisztítási eljárások</i>	<i>19</i>
<i>A trombociták izolálása.....</i>	<i>21</i>
<i>A trombocita szubcelluláris frakciók elkülönítése</i>	<i>22</i>
<i>Western-blot</i>	<i>22</i>
<i>A foszforiláció hatása a trombocita citoszkeleton foszfatáz aktivitására</i>	<i>23</i>
<i>GST-MYPT1, GST-MYPT1-C és MLC20 foszforilációja trombocita citoskeletális kinázokkal.....</i>	<i>23</i>
<i>MYPT1 és MYPT1 mutánsok foszforilációja</i>	<i>24</i>
<i>A foszforilált MYPT1 mutánsok hatása a PP1c miozin foszfatáz aktivitására</i>	<i>24</i>
<i>Kináz aktivitás kimutatása SDS-PAGE után</i>	<i>25</i>
<i>ZIP-kináz és ILK elválasztása és részleges tisztítása trombocita citoskeletonból</i>	<i>25</i>
<i>A MYPT1 ILK foszforilációs helyeinek azonosítása</i>	<i>26</i>
EREDMÉNYEK.....	27
<i>A miozin foszfatáz kimutatása trombocita citoskeletonban.....</i>	<i>27</i>
<i>A MgATP és MgATP-γS hatása a trombocita citoskeleton miozin foszfatáz és foszforiláz foszfatáz aktivitására.....</i>	<i>28</i>
<i>Rho-kináz inhibitorok hatása a MgATPγS hatására bekövetkező, foszfatáz aktivitás csökkenésre.....</i>	<i>29</i>
<i>A MYPT1 foszforilációja trombocita citoskeletális kinázokkal a gátló helyen (Thr695).....</i>	<i>31</i>
<i>A trombocita citoskeletonhoz asszociálódó kinázok azonosítása.....</i>	<i>32</i>
<i>ILK és ZIP-kináz elválasztása trombocita citoskeletonból SP-Sepharose kromatográfiával</i>	<i>33</i>
<i>A GST-MYPT1 foszforilációja trombocita citoskeleton ILK-zal.....</i>	<i>34</i>

<i>MLC20, GST-MYPT1 és GST-MYPT1-C foszforilációja ZIP-kinázzal és ILK-zal.....</i>	<i>36</i>
<i>Az ILK asszociációja a miozin foszfáttal</i>	<i>37</i>
<i>A GST-MYPT1 illetve MYPT1 mutánsok foszforilációja ILK-zal.....</i>	<i>38</i>
<i>A MYPT1 ILK foszforilációs helyeinek azonosítása</i>	<i>39</i>
<i>Különböző kinázokkal foszforilált MYPT1 hatása a PP1c aktivitására</i>	<i>39</i>
<i>Foszforilált MYPT1 N- és C-terminális deléciós mutánsok hatása a PP1c aktivitásra.....</i>	<i>40</i>
MEGBESZÉLÉS	41
ÖSSZEFOGLALÁS	46
SUMMARY.....	47
IRODALOMJEGYZÉK	48
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	54
FÜGGELÉK	55

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP:	adenozin-5'-trifoszfát
ATP-γS:	adenozin-5'-O-(γ-tio)trifoszfát
cAMP:	ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát
cGMP:	ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát
BSA:	borjú szérum albumin
CPI-17:	17 kDa PKC-vel aktivált inhibitor
[Ca ²⁺] _i :	intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció
CaM:	kalmodulin
DAG:	diacil-glicerol
DARPP-32:	32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein
DFP:	diizopropil-fluorofoszfát
DTT:	ditiotritol
EDTA:	etiléndiamin-tetraacetát
EGTA:	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
G _L :	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége májban
G _M :	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége vázizomban
GST:	glutation-S-transzferáz
GTP:	guanozin-5'-trifoszfát
GTP-γS:	guanozin-5'-O-(γ-tio)trifoszfát
ILK:	integrinekhez kapcsolódó kináz
IPTG:	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
MLC20:	a miozin 20 kDa könnyűlánc
M20/21:	a miozin foszfataz 20/21 kDa regulátor alegysége
MLCK:	miozin könnyűlánc kináz
MYPT:	miozin foszfataz regulátor alegység
NIPP-1:	nukleáris protein foszfataz-1 inhibitor
PAGE:	poliakrilamid-gélelektroforézis
P _i :	anorganikus foszfát
PHI-1:	foszfataz holoenzim inhibitor-1
PKA:	cAMP-függő protein kináz
PKC:	protein kináz C
PKG:	cGMP-függő protein kináz
PKN	protein kináz N
PMSF:	fenil-metil-szulfonil fluorid
PP1:	protein foszfataz-1
PP1c:	protein foszfataz-1 katalitikus alegység
PP2A:	protein foszfataz-2A
PP2B:	protein foszfataz-2B
PP2C:	protein foszfataz-2C
Rho:	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
RhoGEF:	Rho specifikus nukleotid kicserélő faktor
SDS:	nátrium-dodecilszulfát
SP-Sepharose:	szulfopropil-Sepharose
TCA:	triklór-ecetsav
ZIP-kináz:	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz
32 kDa ZIP-kináz:	ZIP-kináz katalitikus doménnel homológiát mutató protein kináz

BEVEZETÉS

A fehérjék kovalens módosítása a szerin (Ser), treonin (Thr) és tirozin (Tyr) oldalláncok foszforilációjával és defoszforilációjával a sejtfolymatok szabályozásának egyik fontos mechanizmusa. A sejtfehérjék nyugalmi állapotra jellemző foszforilációs szintjét, ill. azok a sejtet ért hatásokra (receptor aktiválás, membránpotenciál változás, növekedési faktorok stb.) bekövetkező változását a foszforilációt katalizáló protein kinázok és a defoszforilációt katalizáló protein foszfatázok aktivitásának aránya szabja meg. Óvatos becslések szerint a sejtfehérjék kb. egyharmada foszforilálódik, ami számos protein kináz és foszfatáz létezését, valamint aktivitásuk összehangolt szabályozását feltételezi a sejtek fiziológiai állapotának megfelelő foszforilációs szint kialakulásában. A fehérjék foszforilációja túlnyomórészt Ser és Thr oldalláncokon játszódik le ($> 90\%$), ezért ezt a módosítást ismerték fel először, valamint ennek következtében a Ser/Thr specifikus protein kinázok és foszfatázok szabályozási lehetőségeinek vizsgálata került kezdetben előtérbe. Ma már általánosan elfogadott az a nézet, hogy a fehérjék foszforilációjában a protein kinázok és foszfatázok egyenrangú partnerek és mindkét enzim szabályozása hozzájárul a megfelelő foszforilációs szint kialakulásához.

A simaizom összehúzóds ill. a sejtek kontraktilis sajátságainak tanulmányozása a protein kináz és foszfatáz szabályozási lehetőségek vizsgálatának egyik kedvelt modellrendszere. Ezen fiziológiai és farmakológiai szempontból is fontos folymatok lejátszódásának előfeltétele a miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja. Az MLC20 megfelelő mértékű foszforilációját, valamint a foszforilációs állapot fenntartását a kontrakciós mechanizmusok klasszikus elmélete szerint Ca^{2+} -függő miozin kináz(ok) aktiválódása biztosítja. Az utóbbi években emellett azonban kimutatták, hogy az izom összehúzóds (vagy pl. a sejtek alakváltozása), valamint a miozin foszforilációja viszonylag alacsony intracelluláris Ca^{2+} koncentrációknál is megvalósul, amelyben a miozint foszforiláló nem Ca^{2+} -függő kinázok és a miozin foszfatáz átmeneti gátlása játszik fontos szerepet. Ezek a felismerések a miozint, valamint a miozin foszfatázt foszforiláló kinázok azonosításának fontosságára irányították a figyelmet. Munkám célkitűzései is ezen kérdések vizsgálatához kapcsolódtak.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Protein foszfatáz-1 holoenzimek: szerkezet, szabályozás

A humán genom több mint 500 protein kináz gént tartalmaz, ezek közel kétharmada kódol szerin/treonin specifikus kinázokat. A protein foszfatáz gének száma ezzel szemben csak 150, amelyek közül kevesebb, mint 40 kódol foszfoszerin/treonin specifikus protein foszfatáz katalitikus alegységet (Cohen, 2002). A protein foszfatáz katalitikus alegységek biológiai funkcióit gyakran a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységek szabályozzák. A protein kinázok genetikai sokszínűségét tehát a nagymértékben konzervált protein foszfatáz katalitikus alegységek változatos regulátor fehérjékkel való asszociációja egyenlíti ki. A regulátor fehérjék szabályozhatják a protein foszfatázok szubsztrátspecifitását, katalitikus aktivitását valamint sejten belüli lokalizációját is. Vizsgálataink a protein foszfatáz 1 (PP1) katalitikus alegységét (PP1c) tartalmazó miozin foszfatáz szabályozására irányultak, ezért a továbbiakban elsősorban a PP1c-re és PP1c-kötő fehérjékre vonatkozó irodalmi eredményeket ismertetem.

Protein foszfatáz-1 katalitikus alegység

Emlős sejtekben a Ser/Thr specifikus protein foszfatázoknak négy altípusa, a protein foszfatáz-1 (PP1), -2A (PP2A), -2B (PP2B), -2C (PP2C) fordul elő legnagyobb mennyiségben. A különböző típusú enzimeket gátló fehérjék és toxinok iránti érzékenységük, szubsztrátspecifitásuk, valamint aktivitásuk fémion függése alapján különböztetik meg (Ingebristen és Cohen, 1983;+

Dombrádi 1997). A PP1 aktivitása inhibitor fehérjékkel (inhibitor-1, inhibitor-2) gátlható (Ingebristen és Cohen, 1983), ezek a fehérjék azonban a PP2 enzimek aktivitását nem befolyásolják. A PP2A aktivitásához extra fémion nem szükséges; míg a PP2B Ca^{2+} -, a PP2C Mg^{2+} -függő enzimek. Membránpermeabilis toxinok (pl. okadainsav, kalikulin A, kantaridin származékok) a PP1 és PP2A enzimek aktivitását gátolják (MacKintosh és mtsai, 1994; Erdődi és mtsai, 1995).

A PP1 katalitikus alegység (PP1c, 36-38 kDa) négy izoformáját azonosították (PP1 α , PP1 γ 1, PP1 γ 2, PP1 δ), amelyek szekvenciájukban nagyfokú (közel 90%) azonosságot mutatnak. A PP1 katalitikus alegységek *in vitro* szubsztrátspecifitásuk, illetve regulátor/inhibitor fehérjékhez való affinitásuk alapján nem különböztethetők meg (Zhang és mtsai, 1993). *In vivo* feltételezhető bizonyos fehérjék izoforma specifikus kötődése a PP1c-hez, amelyre a PP1c izoenzimek eltérő szubcelluláris megoszlása utal

(Shima és mtsai, 1993; da Cruz e Silva és mtsai, 1995; Andreassen és mtsai, 1998). A különböző PP1c izoforma mutációt hordozó eltérő *Drosophila* fenotípusok megjelenése szintén a PP1c izoenzimek specifikus részvételét feltételezi különböző sejtfunkciók szabályozásában (Axton és mtsai, 1990, Raghavan és mtsai, 2000).

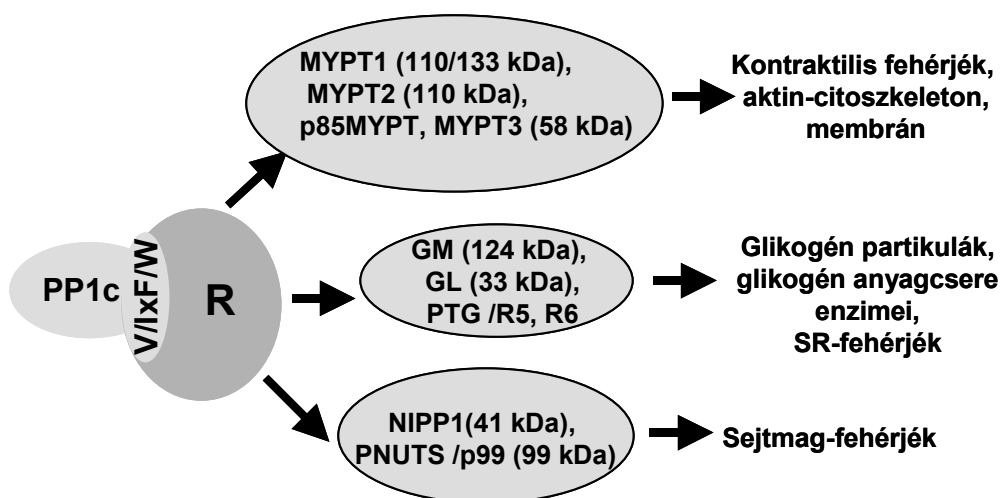
PP1c regulátor alegységek

A PP1 holoenzimek általános szerkezetüket tekintve a PP1c valamely izoformájából és különböző regulátor (R) alegységből állnak. Közel 50 PP1c-kötő fehérje létezéséről tudunk, amelyek katalitikus alegységre gyakorolt hatásuk alapján az úgynevezett „célra irányító” fehérjék és az aktivitást gátló fehérjék csoportjába sorolhatóak (Bollen, 2001; Cohen, 2002).

A „célra irányító” fehérjék a katalitikus alegységhez kapcsolódnak és azt a szubsztrát fehérjéhez vagy a szubsztrátot tartalmazó szubcelluláris kompartmenthez „rögzítik”. A „célra irányító” regulátor alegységek gyakran befolyásolják a katalitikus alegység aktivitását, illetve szubsztrátspecifitását is. A glikogén partikulákban található PP1 holoenzim a PP1c mellett egy glikogénhez is kötődő regulátor alegységet (emlősökben G_M, G_L, PTG/R5 vagy R6) tartalmaz. Valamennyi eddig ismert glikogénkötő alegység konzervált N-terminális részén azonosítottak egy poliszacharid kötő motívumot (Wu és mtsai, 1998). A G_L (33 kDa) alegység májban, a G_M (124 kDa) szív-és vázizomban, a PTG/R5 és a R6 számos szövetben irányítja a katalitikus alegységet a glikogén partikulák felé, ahol az a glikogén metabolizmus szabályozásában játszik szerepet. A sejtmagban található nagy mennyiségű PP1c mellett két inhibitor fehérjét mutattak ki. A NIPPI és PNUTS/p99 fehérjék a PP1c-en kívül mRNS-hez is kapcsolódnak, amely alapján feltételezik, hogy a PP1c az RNS-hez kötődő eddig még nem jellemzett fehérjék defoszforilációjában vesz részt. A kontraktilis fehérjékhez kapcsolódó miozin foszfatázban a PP1c-t a MYPT alegységek (MYPT1, MYPT2) irányítják a célfehérje, leginkább a foszforilált miozin felé. A miozin foszfatáz holoenzim alegységszerkezetét és szabályozását a dolgozat később részletesen tárgyalja. Az *I. ábra* a legfontosabb R alegységek sejten belüli lokalizációját foglalja össze (ld hivatkozásokat Cohen, 2002).

A PP1c aktivitás citoszolikus inhibitor fehérjék is szabályozhatják. Az inhibitor-1, DARPP-32 és CPI-17 foszforiláció függő inhibitorok (ld hivatkozásokat Cohen, 2002). Az inhibitor-1 és a DARPP-32 PKA-val, a CPI-17 PKC-vel történő foszforiláció után válik hatásos PP1c inhibitorrá. Az inhibitor fehérjében a foszfortreonin és a környezetében

elhelyezkedő aminosavak pszeudo-szubsztrátként viselkedve elfoglalják a PP1c katalitikus centrumát (Goldberg és mtsai, 1995).



1. ábra PP1c kapcsolódása regulátor („célra irányító”) fehérjékhez a különböző holoenzimformák sejtben belüli lokalizációja

Az inhibitor-1 általánosan előfordul; a DARPP-32 expressziója elsősorban az agy dopaminerg beidegzés alatt álló területein mutatható ki. A CPI-17 elsősorban simaizomban fordul elő és a miozin foszfatázra specifikus inhibitornak tekintik. Az citoszolikus inhibitor-2 fehérje defoszforilált formában gátolja a PP1c aktivitást. A PP1c-inhibitor-2 komplex feltehetőleg PP1c raktáráként funkcionál. Mivel az inhibitor-2 elősegíti a PP1c natív térszerkezetének kialakulását, egyes feltételezések szerint chaperon fehérjékhez hasonló funkciót is ellát (Alessi és mtsai, 1993; MacKintosh és mtsai, 1996).

A regulátor fehérjék rendkívül változatosak, szekvenciahomológia csak izoformák esetén található. A nagyfokú változatosság ellenére azonban általában megtalálható bennük egy rövid szekvenciamotívum (K/R-x₁-V/I-x₂-F/W), amely specifikus kötődést biztosít a katalitikus alegységhez (Endo és mtsai, 1996; Egloff és mtsai, 1997). Mivel a kötőmotívumban az x₁ maradék jelenléte nem feltétel gyakran csak a V/Ix/F/W szekvencia motívum jelenléte is elegendő a kölcsönhatás kialakulásához. A PP1c-kötő motívumot elsőként az inhibitor-1 fehérjében azonosították (Endo és mtsai, 1996) és a kötőmotívum valamint a PP1c között kialakuló kapcsolat szerkezeti sajátosságaira a PP1c és a G_M alegység kötőmotívumát tartalmazó peptidszakasz (13 aminosav) komplexének röntgenkristallográfiai analízise szolgáltatott adatokat. A kötőmotívum a PP1c-vel a katalitikus centrumtól távol eső felszíni hidrofób régió keresztül létesít kölcsönhatást (Egloff és mtsai, 1997), amelyet erősíthetnek a kötőmotívumot megelőző bázikus

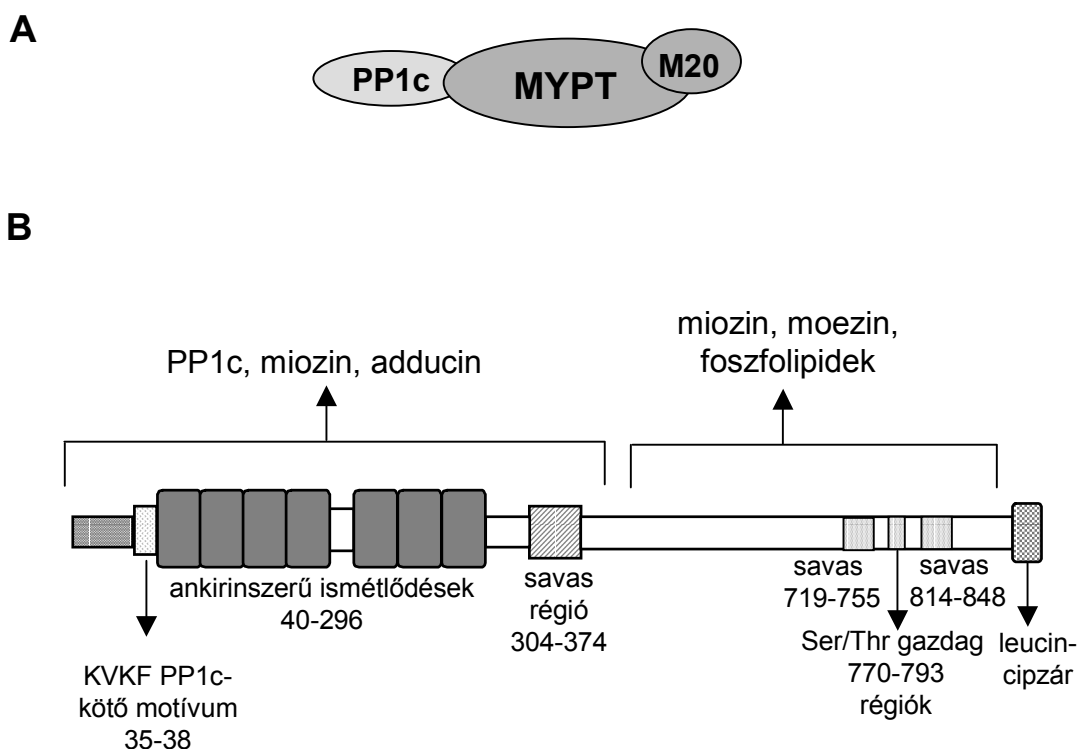
aminosavak és a PP1c savas oldalláncai között kialakuló kapcsolatok is. A PP1c-kötő motívumot tartalmazó regulátor alegységek esetén a motívum jelenléte esszenciális a kölcsönhatás kialakulásában, amelyet más, másodlagos kötőhelyek is erősíthetnek. A másodlagos kötőhelyeknek emellett szerepe lehet a PP1c katalitikus aktivitásának szabályozásában is. A dolgozat témája a miozin foszfatáz holoenzim szabályozásához kapcsolódik, így részletesebben a PP1 holoenzimek közül csak ennek az enzimnek a szerkezetét ismertetem.

A miozin foszfatáz alegységszerkezete

A miozin foszfatáz (MP) három alegységből álló formáját először simaizomból (zúza) izolálták (Alessi és mtsai, 1992). A holoenzimben a PP1c-hez a 130/133 kDa MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) és a 20/21 kDa M20/21 alegységek kapcsolódnak (2/A. ábra). A MYPT1 alegységeket csirke zúza (Shimizu és mtsai, 1994) és patkány aorta (Chen és mtsai, 1994) könyvtárból klónozták, és kimutatták egy hosszabb és egy rövidebb izoforma létezését is. A 130 és a 133 kDa látszólagos molekulatömegű fehérjék a MYPT1 molekula középső szakaszán elhelyezkedő körülbelül 50 aminosavat tartalmazó inzert jelenlétében különböznek. Az aorta és zúza MYPT1 izoformák továbbá a molekula C-terminális szekvenciájában is különböznek, ahol az aorta fehérje leucin cipzár szekvenciát tartalmaz, ami a zúza izoformában nem található meg. A részletesebben tanulmányozott MYPT1 mellett ismertek más MYPT izoformák is. A vázizom és szívizom szövetekben előforduló MYPT2 szekvenciája 61% (Fujioka és mtsai, 1998), a számos szövetben előforduló MYPT3 (Skinner és Saltiel, 2001) és p85 (Tan és mtsai, 2001) kisebb mértékű, kevesebb mint 40 % homológiát mutat a MYPT1-el. A MYPT1 szerkezetét a fehérjét alkotó szerkezeti egységek feltüntetésével a 2/B. ábra mutatja be.

A MYPT1 szerkezeti részeinek funkcióját az alegység kölcsönhatásban molekuláris biológiai (két-hibrid módszerek, deléciós mutánsok előállítása) és biokémiai módszerekkel jellemezték. Ezen eredmények alapján célfehérjék (miozin, moezin, adducin) az N- és C-terminális régiókhoz egyaránt kapcsolódhatnak. A miozinnal való kölcsönhatásban az N-terminális, ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó szerkezeti részek és a C-terminális régiók is szerepet játszanak (Ichikawa és mtsai, 1996; Johnson és mtsai, 1997). Az adducin a molekula N-terminális ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó részéhez (Kimura és mtsai, 1998), a moezin a molekula C-terminális régióihoz (Fukata és mtsai, 1998) kötődik (2/B. ábra). A MYPT1 C-terminális régiója emellett foszfolipidekhez (Ito és mtsai, 1997) és a 20/21 kDa alegységhez (Hirano és mtsai, 1997; Johnson és mtsai, 1997) is

kapcsolódhat (2/B. ábra). A PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régióinak van alapvető szerepe, amelyek közül elsődleges fontosságú a ³⁵KVKF³⁸ PP1c-kötő motívumnak megfelelő szekvencia (Hirano és mtsai, 1997; Johnson és mtsai, 1997) (2/B. ábra). Felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló technikával vizsgálva a MYPT1 és PP1c között kialakuló kölcsönhatásokat kimutattuk, hogy a kötőmotívum kapcsolódása további három MYPT1 régió kötődését is indukálja, amelyek stabilizálják a kölcsönhatást (Tóth és mtsai, 2000). A PP1c-kötő motívum kötődését a MYPT1¹⁻²² régió kapcsolódása követi, amely elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ illetve a



savas régiót tartalmazó MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ kötődését is (2/B. ábra).

2. ábra A miozin foszfatáz alegységszerkezete és a MYPT1 főbb szerkezeti egységei

A: A miozin foszfatáz holoenzim alegységszerkezete; B: MYPT1 fehérje szerkezete, jellemző régiói, a kapcsolódó fehérjék feltüntetésével

A miozin foszforiláció szerepe a simaizom összehúzóásban

A miozin foszforilációja és defoszforilációja a simaizom összehúzóás és elernyedés fontos szabályozási mechanizmusa. Az izom összehúzóása elsődlegesen membrán depolarizáció és agonisták (angiotenzin, α_1 -adrenerg agonisták) receptorokkal történő kölcsönhatásával váltható ki, amelyben fontos szerepe van az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) növekedésének. Az extracelluláris térből beáramló és/vagy a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} -ok kalmodulinhoz (CaM) kötődnek, amely a miozin könnyűlánc kinázt (MLCK) aktiválja. Az aktivált MLCK a Ser 19/Thr 18

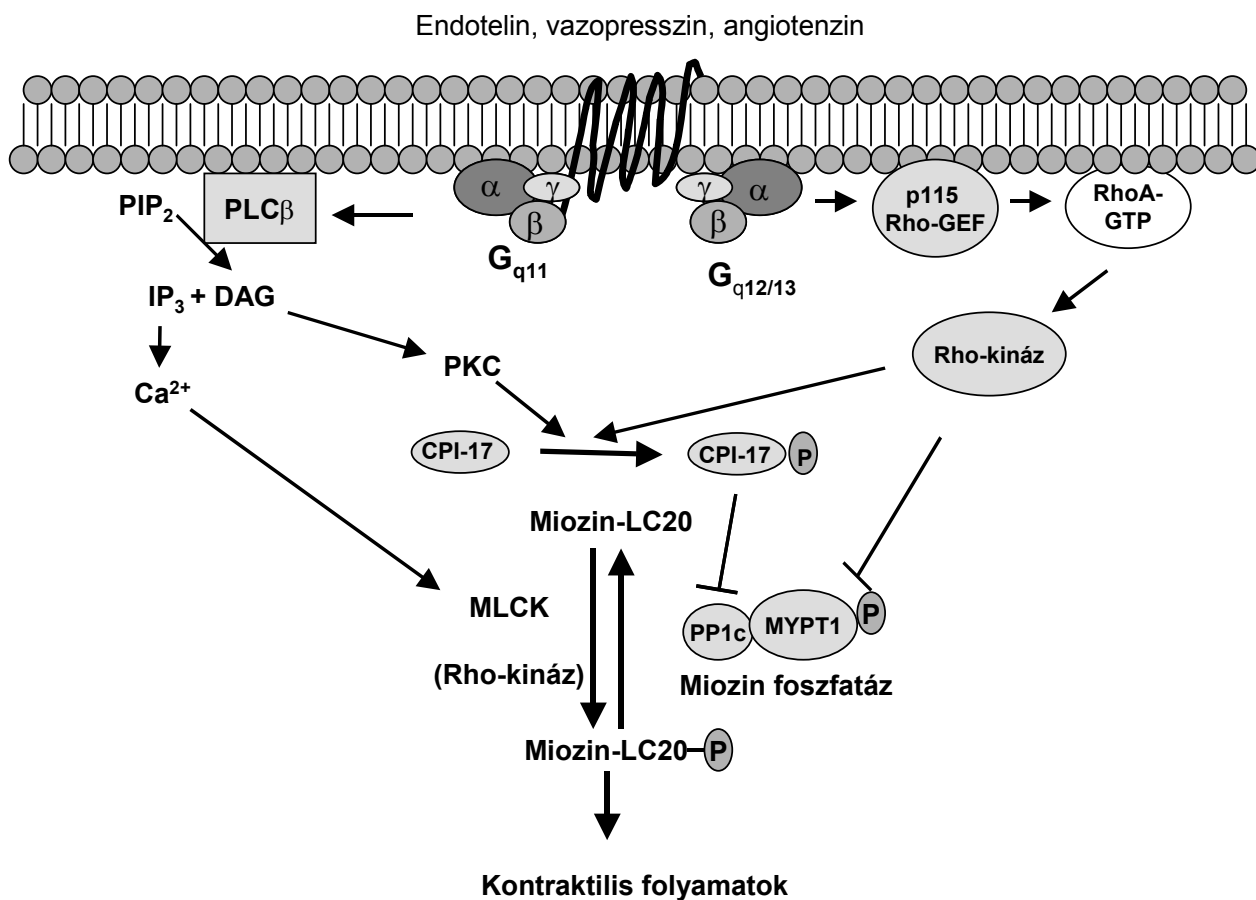
oldalláncokon foszforilálja a miozin 20 kDa könnyűláncát (MLC20). A miozin foszforilációjának következtében növekszik az aktin aktivált ATPáz aktivitás és ez elősegíti az izom összehúzódását (Somlyo és Somlyo, 1994). A foszforilált miozin defoszforilációját a miozin foszfatáz katalizálja (Hartshorne és mtsai, 1998). A miozin foszfatázt a fenti folyamatban sokáig olyan állandó aktivitású enzimnek hitték, amelynek szerepe a miozin defoszforilációja és ezzel az izom elernyedésének elősegítése. A defoszforilációs folyamatok szabályozásának jelentőségére a sejtp permeábilis PP1 és PP2A gátló toxinokkal (okadainsav, kalikulin A) végzett kísérletek hívták fel a figyelmet. A protein foszfatázok gátlása pl. alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett is képes izomösszehúzódást (Weber és mtsai, 1999) vagy pl. trombocita alakváltozást (Kurisaki és mtsai, 1995; Murányi és mtsai, 1998) előidézni. A PP1 és a PP2A gátlásával a protein kináz/foszfatáz aktivitás arány változik, amely Ca^{2+} -tól független protein kinázok részvételével jelentős mértékű miozin foszforilációt eredményez akkor is, ha az MLCK inaktív.

A alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett megvalósuló simaizom összehúzódás a következő két egymással szorosan összefüggő folyamat eredménye:

1. *Ca^{2+} -érzékenyítés:* A miozin foszfatáz aktivitás gátlása az enzim MYPT1 alegységének foszforilációja által, amely a MLC20 foszforilációjának növekedését eredményezi.
2. *Ca^{2+} -tól független izomösszehúzódás:* A MLC20 foszforilációja Ca^{2+} -tól független kinázokkal.

Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett izomösszehúzódási folyamatok figyelhetők meg pl. tromboxán hatására, amelynek során hét-transzmembrán doménnel rendelkező receptorokon keresztül a $G_{q12/13}$ heterotrimer G-fehérjék aktiválódnak. A felszabaduló $G_{q12/13\alpha}$ a p115Rho-GEF nukleotid kicserélő faktort aktiválja, amely elősegíti az aktív konformációjú RhoA (RhoA-GTP komplex) kialakulását. A RhoA-GTP kötődik a Rho-kinázhoz, és növeli annak kináz aktivitását (Somlyo és Somlyo, 2000). A Rho-kináz a MYPT1 alegységet foszforilálva gátolja a miozin foszfatáz aktivitást (Feng és mtsai, 1999a). A Rho-kináz aktivitás Rho-kinázra specifikus inhibitorral (Y27632) gátolható, amelynek hatására a simaizom sejteken kiváltott összehúzódás és a nem-izom sejtek citoskeletális változásai (stressz-kábelek fokozódása, fokális-addhézió kialakulása) gátolhatók (Uehata és mtsai, 1997). A Rho-kináz *in vitro* a miozin foszfatáz (Feng és mtsai, 1999b) mellett a miozint is foszforilálja (Amano és mtsai, 1996). A miozin *in vivo* foszforilációja Rho-kinázzal a simaizom összehúzódás esetén kisebb jelentőségű (Sward, és mtsai, 2000), ezzel szemben fontos szerepe lehet a nem-izom sejtekben kialakuló

citoszkeletális változások kialakításában, így pl. trombociták alakváltozása (Bauer és mtsai, 1999; Paul és mtsai, 1999; Suzuki és mtsai, 1999) és a fibroblaszt sejtek stressz-kábel képződése során (Totsukawa és mtsai, 2000).



3. ábra A miozin foszforiláció szabályozása a simaizom összehúzódás során

Endothelin, vazopresszin valamint angiotenzin hatására a Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -tól független módon aktiválódó folyamatok egymással párhuzamosan valósulnak meg a G_{q11} és a $\text{G}_{q12/13}$ fehérjékhez egyaránt kapcsolódó receptorokon keresztül. Az aktivációt követően szabaddá vált $\text{G}_{q11\alpha}$ aktiválja a foszfolipáz-C β -át ($\text{PLC}\beta$) és növeli az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -öt, amely hatására az MLCK aktiválódik és ez foszforilálja a MLC20-ot. Ezzel párhuzamosan a monomer $\text{G}_{q12/13\alpha}$ fehérje a RhoA/Rho-kináz útvonal aktiválásával és a miozin defoszforiláció gátlásával szintén hozzájárul a foszforilált miozin mennyiségének növekedéséhez. (Gohla és mtsai, 2000) (3. ábra).

Napjainkban olyan protein kinázokat is azonosítottak, amelyek aktivitásának szabályozása még nem ismert. Ezek a kinázok képesek a MYPT1-et és/vagy MLC20-ot foszforilálni, ezért szerepük feltételezhető a Ca^{2+} -érzékenyítési folyamatokban. A ZIP-

kináz (52-54 kDa, Zipper-Interacting Kinase), amelyet mint az apoptotikus folyamatokat kísérő alakváltozásokban szerepet játszó magfehérjét azonosítottak (Kawai és mtsai, 1998) a MLC20-ot foszforilálva segíti elő a Ca^{2+} -tól független kontrakció kialakulását (Niiró és mtsai, 2001). A miozin foszfatáz holoenzimhez asszociálódó, ZIP-kinázhoz hasonló 32 kDa ZIP-kináz (az 52-54 kDa ZIP-kináz katalitikus doménjével homológ fehérje), a MYPT1 alegységet foszforilálva gátolja a miozin foszfatáz aktivitást és ezzel hozzájárul a Ca^{2+} -érzékenyítés kialakulásához (MacDonald és mtsai, 2001a). A sejtek és az extracelluláris mátrix kölcsönhatását szabályozó integrinekhez kapcsolódó ILK ILK (Integrin-Linked-Kinase) (Wu és Dehlar, 2001) szintén foszforilálja a MLC20-ot és részt vesz Ca^{2+} -tól független kontraktilis folyamatok kialakulásában (Deng és mtsai, 2001).

A miozin foszfatáz szabályozása

A miozin foszfatáz szabályozása MYPT1 foszforilációjával

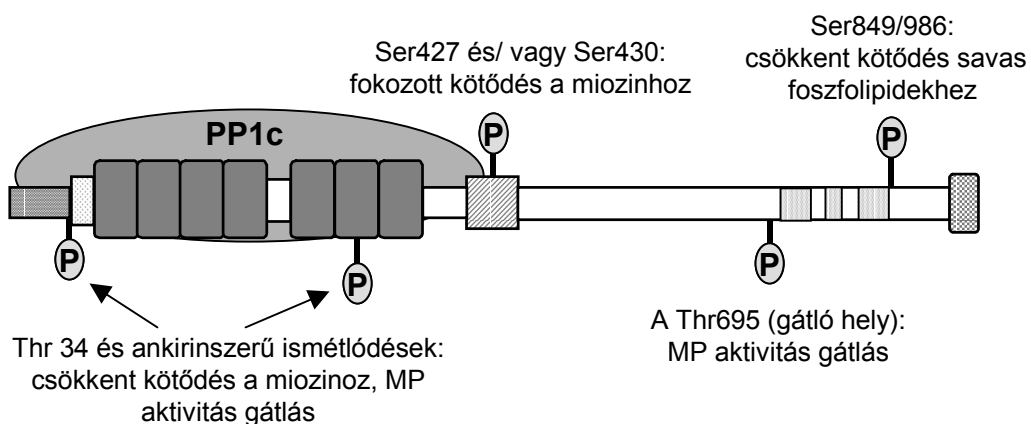
Az előző fejezetben leírt Rho-kináz és a 32 kDa ZIP-kináz hatására kialakuló Ca^{2+} -érzékenyítés során a miozin foszfatáz aktivitás gátlódik, amelynek egyik lehetséges módja a regulátor MYPT1 alegység foszforilációja a gátló foszforilációs helyen, a Thr695 aminosav maradékon (a zúza 133 kDa izoformának megfelelő számozás szerint). A gátló foszforilációs hely megtalálható a MYPT1 (Feng és mtsai, 1999a), a MYPT2 (Fujioka és mtsai, 1998) és a p85 (Tan és mtsai, 2001) izoformákban is, amely hasonló foszforilációs szabályozási mechanizmus meglétére utal olyan sejtekben is, amelyekben a MYPT1 izoforma nem expresszálódik (vázizom, szív).

A MYPT1 C-terminális szakaszát a PKA (Ito és mtsai, 1997) és a PKG is foszforilálja (Ser 849/986) (Nakamura és mtsai, 1999), amely a miozin foszfatáz aktivitását nem befolyásolja, de gyengíti a MYPT1 és a foszfolipidek között kialakuló kölcsönhatást. A foszfolipidek gátolják a miozin foszfatáz aktivitását, így a PKA/PKG hatására bekövetkező MYPT1 foszforiláció miozin foszfatáz aktivitás növekedést eredményezhet, amely elősegíti a miozin defoszforilációját és az izom elernyedést. A cGMP szint növekedés hatására kialakuló izomelernyedés egyik lehetséges mechanizmusa a cGMP függő protein kináz 1 α hatására (PKG1 α) megvalósuló MYPT1 foszforiláció és miozin foszfatáz aktivitás növekedés. A fázisos típusú zúza és a tónusos aorta simaizmok cGMP iránti érzékenysége eltérő, amelyet az is magyarázhat, hogy a szövetek eltérő MYPT1 izoformákat expresszálnak. Az aorta MYPT1 leucin zipzár motívumot tartalmaz, ami a zúza MYPT1-ben nincs jelen. A leucin zipzár specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatások

kialakulását teszi lehetővé. A PKG1 α pl. önmaga is tartalmaz ilyen szekvencia motívumokat, amelyen keresztül képes a MYPT1 hasonló régiójához kapcsolódni. A leucin zipzár jelenléte szükséges feltétele a PKG1 α által katalizált MYPT1 foszforilációnak (Sturk és mtsai, 1999). A PKG1 α hatására bekövetkező MYPT1 foszforiláció szerepét az izomelernyedés kialakulásában alátámasztja, hogy a cGMP csak olyan simaizom szövetekben képes elernyedés kiváltására (pl. aorta) ahol a leucin zipzárt tartalmazó MYPT1 izoforma expresszálódik (Khatri és mtsai, 2001).

A MYPT1 savas régiójában található Ser427 és/agy Ser 430 oldalláncokat mitózis során aktiválódó protein kináz(ok) foszforilálják. A foszforiláció hatására fokozódik a miozin kötődése a MYPT1 molekulához, és ez a miozin foszfatáz aktivitás növekedésében nyilvánul meg. Ezzel fokozódik a miozin defoszforilációja, ami elősegíti a profázisba lépő sejtek stressz- kábeleinek felbomlását (Totsukawa és mtsai, 1999).

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a PKC a MYPT1 PP1c-kötő motívum előtt elhelyezkedő Thr34 oldalláncát is foszforilálja (Tóth és mtsai, 2000). Ellentétben azonban más PP1c regulátor alegységekkel (G_M, NIPP), ahol a kötőmotívum környezetében bekövetkező foszforilációnak hatása van a PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásra (Hubbard és Cohen, 1993; Beullens és mtsai, 1999), a miozin foszfatáz esetén a foszforiláció nem befolyásolta a PP1c és a MYPT1 peptid kölcsönhatást. A PKC a MYPT1 ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó régióját is foszforilálja és csökkenti a MYPT1 miozinhoz és PP1c-hez való kötődését. A MYPT1 fehérje szerkezetét, a foszforilációs helyeket, valamint foszforiláció hatását a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 alegység foszforilációjával

A miozin foszfatáz szabályozása a CPI-17 inhibitor fehérje foszforilációjával

A miozin foszfatáz aktivitás szabályozásában a MYPT1 közvetlen foszforilációján kívül inhibitor fehérjék is szerepet játszanak. A CPI-17 fehérje (17 kDa C-kinase potentiated inhibitor) elsősorban simaizomban fordul elő (Seba és mtsai, 1999) és PKC-vel történő foszforilációját követően gátolja a miozin foszfatáz aktivitását (Eto és mtsai, 1997) (3. ábra). A PKC mellett a PKN (Hamaguchi és mtsai, 2000), a Rho-kináz (Koyama és mtsai, 2000), a 32 kDa ZIP-kináz (MacDonald és mtsai, 2001b) valamint az ILK (Deng és mtsai, 2002) is képes a CPI-17 fehérjét a gátló, Thr38 oldalláncon foszforilálni. A CPI-17 foszforilációja *in vivo* artériás simaizomban is kimutatható hisztamin kezelés hatására (Kitazawa és mtsai, 2000). A CPI-17-ez hasonló fehérjék nem-izom sejtekben is előfordulnak. A PHI-1 (phosphatase holoenzyme inhibitor 1) megtalálható például a legtöbb sejttypusban, és hasonlóan a CPI-17-hez gátló hatásúvá PKC-vel vagy ILK-zal történő foszforiláció után válik (Eto és mtsai, 1999, Deng és mtsai, 2002).

A miozin foszfatáz lokalizációjának szerepe a foszfatáz aktivitás szabályozásában

A RhoA fehérje aktív formája membránhoz kötődik (Gong és mtsai, 1997), így a Rho-kináz membrán lokalizációját is feltételeznünk kell a Ca^{2+} -érzékenyítéssel járó folyamatban. Az, hogy az aktiválódott Rho-kináz, vagy az általa közvetített jel hogyan jut el a kontraktilis fehérjékig még nem tisztázott. MacDonald és mtsai (2001a) feltételezik, hogy a 32 kDa ZIP-kináznak van közvetítő szerepe a Rho-kináz és a MYPT1 közötti jelátviteli úton. Portális véna simaizomban kimutatták, hogy $\text{PGF}_2\alpha$ hatására a citoszolikus miozin foszfatáz a plazmamembránhoz transzlokálódik, amellyel párhuzamosan kimutatható a MYPT1 foszforilációja is a Thr695 oldalláncon (gátló foszforilációs hely). A foszforilációs reakciót követően a miozin foszfatáz holoenzim disszociál, és a PP1c a citoszolba diffundál (Shin és mtsai, 2002).

A miozin foszfatáz szabályozásában résztvevő foszfofehérjék defoszforilációja

A fent leírt kontrakciós mechanizmusok, és citoskeletális változások kutatásában fontos és eddig még kevésbé kutatott kérdés a szabályozásban részt vevő foszfofehérjék defoszforilációja. A MYPT1 Thr695 oldallancán (gátló hely) kialakuló foszfoészter kötés az ismert foszfatázokkal (PP1, PP2A PP2B PP2C) nehezen hidrolizálható. Ezzel ellentétben a Thr38 oldalláncon foszforilált CPI-17 fehérje PP2A és a PP2C protein foszfatáznak is jó szubsztrátja (Takizawa és mtsai, 2002). Hisztamin kezelés hatására

artériás simaizomban megfigyelhető a MYPT1 és a CPI-17 foszforilációja (Kitazawa és mtsai, 2000; Takizawa és mtsai, 2002), amely az izom összehúzódását eredményezi. Az agonista eltávolítását követő gyors elernyedést azonban csak a foszforilált CPI-17 defoszforilációja követi a relaxáció sebességével összemérhető mértékben. A fenti eredmények alapján tehát a foszforilált miozin mennyiségének gyors megváltoztatásában a CPI-17 inhibitoron keresztül megvalósuló miozin foszfatáz gátlásnak lehet szerepe. MYPT1 foszforilációjának és az ezt kísérő miozin foszfatáz aktivitás gátlásnak inkább lassúbb izomösszehúzódási folyamatokban tulajdonítanak szerepet.

A miozin foszfatáz szabályozása trombocitákban

Nyugvó trombocitákban a citoskeletont két, aktin molekulák által alkotott szerkezeti részre lehet elkülöníteni. A membránskeleton (a későbbiekben csak membrán) a membrán citoplazma felőli oldalát borítja és integrinekhez is kötődik. A citoplazmában elhelyezkedő aktin filamentumok (későbbiekben citoskeleton) a kontraktilis változásokért felelősek és szerepet játszanak az aktivációhoz vezető trombocita folyamatokban (alakváltozás, szekréció és aggregáció (Blockmans, 1995)). A trombocita alakváltozás, az aktiváció első lépése, a már meglévő aktin filamentumok keresztkötésével, valamint új aktin filamentumok kialakulásával a citoskeleton átrendeződéséhez vezet. A szekréció során a granulumok mozgását szintén az aktin filamentumok segítik. Az aggregáció után az aktomiozin komplex a sérülés helyén képződött aggregátum összehúzódását is biztosítja (Fox, 1993).

A trombocita alakváltozás előfeltétele a MLC20 foszforilációja, amelynek mértéke trombocitákban a simaizom sejtekhez hasonlóan a miozin kinázok (MLCK (Sellers, 1991) és/vagy Rho-kináz (Amano és mtsai, 1996)) és a miozin foszfatáz aktivitás arányának függvénye. Sejtpermeabilis Ser/Thr foszfatáz inhibitorok (kalikulin A, okadainsav, tautomycin) trombocitákban alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett képesek miozin foszforiláció és alakváltozás kiváltására (Kurisaki és mtsai, 1995), amely a protein foszfatázok szerepére utal a folyamatban. A trombocitákban a PP1 és a PP2A is megtalálható (Erdődi és mtsai, 1992), lokalizációjuk azonban különbözik. Nyugalmi (nem aktivált) trombociták citoskeletonális frakciójában csak a PP1c mutatható ki (Murányi és mtsai, 1998), a PP2A ebben a frakcióban nincs jelen. A miozin foszfatáz MYPT1 alegysége a citoskeletonális és a membrán frakcióban mutatható ki (Murányi és mtsai, 1998). A kisebb regulátor fehérje (M20) jelenléte trombocita holoenzimben még nem tisztázott (Nakai és mtsai, 1997;

Murányi és mtsai, 1998), mivel immunoblottal egy 14 kDa fehérje MYPT1-től részben eltérő lokalizációját sikerült kimutatni.

A trombocita aktiválódást előidéző agonisták hatásmechanizmusa eltérő. A gyenge agonisták (tromboxán, epinefrin, szerotonin és alacsony koncentrációban a trombin) receptoraktiválás után a $G_{12/13}$ fehérjéket aktiválják, amely RhoA/Rho-kináz jelátviteli útvonalon keresztül eredményez gyors MLC20 foszforilációt (Bauer és mtsai, 1999; Paul és mtsai, 1999). A Rho-kináz közvetlenül foszforilálja a MLC20-ot, de a megnövekedett miozin foszforilációs szinthez a MYPT1 Rho-kinázzal történő gátló foszforilációja, azaz a miozin foszfatáz aktivitás gátlása is hozzájárul (Nakai és mtsai, 1997; Suzuki és mtsai, 1999; Watanabe és mtsai, 2001). A trombin magas koncentrációban a G_q fehérjén keresztül a PLC β -t, így a Ca^{2+} -függő jelátviteli útvonalakat és a PKC-t is aktiválja. Ebben az esetben a Rho-kináz és a PKC párhuzamosan vesz részt a miozin foszfatáz szabályozásában. A Rho-kináz a MYPT1, a PKC pedig a CPI-17 foszforilációjával segíti elő a miozin foszfatáz aktivitás gátlását, és ezzel a miozin foszforilációs szint növekedést (Watanabe és mtsai, 2001).

CÉLKITÚZÉS

A miozin foszforilációjában Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -tól független protein kinázok is szerepet játszanak. Ilyen Ca^{2+} -tól független foszforilációs folyamatok valósulhatnak meg a RhoA/Rho-kináz aktiválását elősegítő jelátviteli folyamatokban, amikor a Rho-kináz kettős funkciót lát el: foszforilálja a miozint, valamint a miozin foszfatáz regulátor alegységét (MYPT1) is. Ez utóbbi a miozin foszfatáz gátlását eredményezi, amely hozzájárul a miozin foszforiláció mértékének növekedéséhez, valamint a foszforilációs jel hosszabb idejű fennmaradásához is. A RhoA/Rho-kináz aktiválását agonisták és specifikus receptorok kölcsönhatása biztosítja. A PP1 és PP2A enzimeket gátló membránpermeábilis toxinok (pl. kalikulin-A, okadainsav stb.) agonisták távollétében is simaizom összehúzódást, trombocita alakváltozást, valamint miozin foszforilációt indukálnak. Ez arra utal, hogy a Rho-kinázon kívül más protein kinázok is szerepet játszhatnak a miozin MLC20 alegységének foszforilációjában. Ilyen kinázként azonosították az ILK-t (Deng és mtsai, 2001) és a ZIP-kinázt (Niuro és mtsai, 2001). Az azonban nem ismert, hogy ezeknek a kinázoknak lehet-e szerepük a miozin foszfatáz MYPT1 alegységének gátló foszforilációjában.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei Ca^{2+} -tól független MYPT1 kináz(ok) és miozin kináz(ok) jelenlétére utaltak humán trombociták citoskeleton, ill. membrán frakcióiban (Murányi és mtsai, 1998). Simaizmokban szintén valószínűsíthető volt új MYPT1 kinázok jelenléte és azok stabil asszociációja a több kromatográfiás lépésben tisztított miozin foszfatáz holoenzimmal (Ichikawa és mtsai, 1995). Ezeket a trombocita és simaizom MYPT1 kinázokat azonban még nem azonosították. Továbbá nem ismertük a foszforiláció hatását a miozin foszfatáz aktivitására, valamint MYPT1-ben az általuk foszforilált foszforilációs helyeket sem. Ezért kutatási célkitűzéseink az alábbiakban foglalhatók össze:

1. A trombocita citoskeletonban lejátszódó foszforilációs folyamatok hatásának tanulmányozása a miozin foszfatáz aktivitására.
2. Trombocita szubcelluláris frakciókban előforduló MYPT1 és miozin kinázok azonosítása.
3. ILK és ZIP-kináz enzimek elválasztása és részleges tisztítása trombocitákból, az izolált enzimek szubsztrátspecifitásának tanulmányozása miozin és MYPT1 szubsztrátokkal.
4. A miozin foszfatáz holoenzimmal asszociálódó MYPT1 kinázok azonosítása, a foszforilációs helyek feltárása, valamint a MYPT1 foszforiláció hatásának vizsgálata a foszfatáz aktivitásra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (IZINTA), kalikulin-A (GIBCO), CNBr-aktivált Sepharose 4B, glutation-Sepharose 4B, SP-Sepharose, MonoQ (Pharmacia), torna-peroxidázzal kapcsolt kecske anti-nyúl, nyúl anti-kecske másodlagos antitestek (SIGMA), hexahisztidin-peptidre specifikus monoklonális antitest (Anti-His-mAb) (Qiagen), nitrocellulóz membrán (0,45 μm pólusméret), kemilumineszcencia (ECL) reagens (Amersham), Ni-NTA Superflow (Qiagen), Rho-kináz, Y-27632, HA1077, anti-ZIP-kináz (Calbiochem), kecske anti-ILK (Santa Cruz Biotech.). Az anti-Rho-kináz (Feng és mtsai, 1999b) és a MYPT1 foszforilált Thr695 oldalláncára specifikus antitestet (anti-MYPT1^{pThr695}) (Feng és mtsai, 1999a) az irodalmi hivatkozásokban leírtak szerint használtuk.

Fehérjetisztítási eljárások

A foszfatáz aktivitás meghatározáshoz szubsztrátként használt [^{32} P]foszforiláz *a*-t Cohen és mtsai (1988), a [^{32} P]MLC20-ot Erdődi és mtsai (1995) módszere alapján állítottuk elő.

Miozin foszfatáz holoenzimet pulyka zúzából tisztítottuk (Shimizu és mtsai, 1994). A rekombináns GST-ZIP-kinázt a ZIP-kináz katalitikus domén szekvenciájának megfelelően (MacDonald és mtsai, 2001a) Dr. David J. Harshorne (The University of Arizona) laboratóriumában állították elő az irodalmi hivatkozásban leírtak szerint.

A csirke zúzából tisztított ILK-t Michael P. Walsh (University of Calgary) laboratóriumában állították elő Deng és mtsai (2001) módszerének megfelelően.

GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása:

A teljes hosszúságú, a csirke zúza 133 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő MYPT1 (Shimizu és mtsai, 1994 (GST-MYPT1)), a Thr695Ala pontmutációt tartalmazó teljes MYPT1 (MYPT1^{T695A}) és a C-terminális 667-1004 aminosavaknak megfelelő (GST-MYPT1-C) fehérjéket *Escherichia coli* BL-21-star sejtekben, pGEX4T1 expressziós rendszert használva állítottuk elő glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjékként. Az expressziós rendszereket Dr. Masaaki Ito (Mie University, Japán) bocsátotta rendelkezésünkre. A rekombináns fehérjék expressziója során minden lépést 37 °C-on és 100 µg/ml ampicillin valamint 30 µg/ml klóramfenikol antibiotikumok jelenlétében végeztünk. Az expresszió első lépéseként a megfelelő plazmidot tartalmazó baktériumokat 1 % agarózt tartalmazó LB (10 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat, 10 g/L NaCl, pH=7,2) lemezre szélesztettük és 16-18 óráig tenyésztettük. Az agarlemezről egy különálló telepet 2x5 ml LB tápoldatba oltottunk és 16 óráig rázattuk, majd a felszaporított baktériumokat 1 literre hígítottuk. Ezt a tenyészetet 3-4-órán keresztül rázattuk (OD₆₀₀=0,8-1) és a rekombináns fehérje expressziót 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd további 3 óra inkubálás után a sejteket centrifugálással (20 000 g, 15 perc) gyűjtöttük össze. A pelletet 2x500 ml PBS-sel (20 mM Na-foszfát (pH=7,2), 115 mM NaCl) mostuk.

A GST-MYPT1 és GST-MYPT1^{T695A} fehérjék tisztítására kétlépéses ioncserés kromatográfiát (SP-Sepharose, MonoQ) alkalmaztunk. SP-Sepharose kromatográfia során a GST-MYPT1 fehérjéket elválasztottuk a bakteriális proteázok többségétől. Az 1 liter LB tápoldatnak megfelelő sejtmennyiséget 10 ml homogenizáló pufferben (30 mM Tris-HCl (pH=7,5), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM DTT, 150 mM NaCl, 2 µg/ml leupeptin, 2

µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF és 50 µg/ml lizozim) szuszpendáltuk. A sejtek lízisét -80 °C-ra történő fagyasztással, majd a felolvasztást követően 3x1 perc szonikálással (Branson 250 Sonifier) segítettük elő. Az oldható frakciót centrifugálással (20 000 g, 20 perc, 4 °C) elválasztottuk a sejtörmeléktől, majd puffer A-val (30 mM Tris-HCl (pH=7,5), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM DTT) az eredeti térfogat kétszeresére hígítottuk és SP-Sepharose oszlopra (10 ml) vittük 2 ml/perc átfolyási sebességgel. Az oszlopot 150 mM NaCl-ot tartalmazó puffer A-val mostuk, majd a GST-MYPT1-et 90 ml 0,15-1 M NaCl gradienssel eluáltuk. A GST-MYPT1-et tartalmazó frakciókat SDS-PAGE-t követő fehérje festéssel (Comassi Blue) azonosítottuk és összegyűjtöttük (0,45-0,75 M NaCl). Az ionerősséget Centricon 30 segítségével végrehajtott puffercserével 50 mM NaCl koncentráció alá csökkentettük és a mintát Mono Q oszlopra (1 ml) vittük fel. Az oszlopot 150 mM NaCl-ot tartalmazó puffer A-val mostuk, majd a kötődő fehérjék elúcióját 20 ml 0,15-0,6 M NaCl gradienssel (puffer A-ban) végeztük. A GST-MYPT1-et SDS-PAGE-t követően a fehérje molekulatömegének megfelelően azonosítottuk, amit MYPT1-re specifikus antitesttel végzett Western-blottal is megerősítettünk.

A GST-MYPT1-C fehérjét glutation-Sepharose 4B affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A fehérje expresszió után 1 liter LB táptalajból összegyűjtött sejteket 20 ml PBS-ben homogenizáltuk proteázgátlók (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF) és 50 µg/ml lizozim jelenlétében. A fehérje tisztítását a lizátum oldható frakciójából végeztük, amelyet a sejtízis (fagyasztás -80 °C-ra, 3x1 perc szonikálás) után centrifugálással (20 000 g, 20 perc, 4 °C) választottunk el. A GST-MYPT1-C-t 1 ml glutation-Sepharose 4B jelenlétében történő inkubálással (12 óra, 4 °C) immobilizáltuk. A mátrixot PBS-sel mostuk és a kötődött rekombináns fehérjét 2x1 ml 20 mM glutationt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH=8) pufferrel eluáltuk.

His-fehérjék előállítása és tisztítása:

A rekombináns PP1cδ (Hirano és mtsai, 1995) és a MYPT1 rövidített mutánsait (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1¹⁻⁵¹¹, His-MYPT1-C (Hirano és mtsai, 1997)) baktériumban expresszáltuk *Escherichia coli* M15 sejtekben, pQE32 expressziós vektort használva, az N-terminális véghez kapcsolódó hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His). A baktériumok felszaporítását a GST fúziós fehérjékhez hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben 100 µg/ml ampicillin, és 25 µg/ml kanamicin antibiotikumokat használtunk. Az 500 ml LB tápoldatból kinyert baktérium pelletet 10 ml PBS-ben

homogenizáltuk proteázgátlók (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF) és 50 µg/ml lizozim jelenlétében. A His-fehérjék az expresszió során az inklúziós testekbe kerültek. A sejtek lízisét (fagyasztás –80 °C-ra, felolvasztás, 3x1 perc szonikálás) követő centrifugálással kapott pelletet 10 ml 1 % TritonX-100 detergenst tartalmazó PBS-sel szuszpendáltuk proteáz inhibitorok jelenlétében (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF) a membrán komponensek eltávolítására. Az inklúziós testeket 10 ml 6 M guanidin-HCl-ot tartalmazó PBS-sel tártuk fel proteázgátlók jelenlétében (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF), majd a fehérjéket Ni-agaróz oszlopra vittük. A bakteriális hisztidin tartalmú fehérjék eltávolítására az oszlopot mosó pufferrel (25 mM Tris-HCl (pH=7,5), 1 mM MnCl₂, 0,8 M NaCl 5 mM imidazol) mostuk, amíg a Bradford módszerrel (Bradford, 1976) meghatározott fehérje koncentráció 0,01 mg/ml alá nem csökkent. Az expresszált fehérjéket 10x1 ml eluáló (25 mM Tris-HCl (pH=7,5), 1 mM MnCl₂, 0,2 M NaCl 100 mM imidazol) pufferrel eluáltuk. A PP1cδ aktivitását a denaturáló körülmények jelentősen csökkentik, ezért aktív enzim előállításához a Ni-agaróz kromatográfiát megelőzően a PP1cδ-t először Mn²⁺-ionok jelenlétében renaturáltuk. A PP1cδ-t tartalmazó 10 ml 6 M guanidin-HCl-dal szuszpendált csapadékot 40 ml 6 M guanidin-HCl/PBS hozzáadásával hígítottuk, majd a fehérjék teljes oldását elősegítendő az oldatot 60 percig szobahőmérsékleten kevertettük. A denaturált fehérjéket tartalmazó 50 ml szuszpenziót 5 liter renaturáló pufferben (50 mM Tris-HCl (pH=7,0), 0,8 M NaCl, 0,4 % 2-merkaptoetanol, 1 mM MnCl₂, 0,02 % Tween 20) lassan adagolva hígítottuk, és újabb 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettük. A renaturáló pufferben lévő hígított PP1cδ-t 1 ml Ni-agarózhoz kötöttük 4 °C-on 16 óráig történő lassú kevertetéssel. Az aktív PP1cδ-t a His-MYPT1 mutánsokhoz hasonló módon eluáltuk a Ni-agarózzal.

A trombociták izolálása

A mosott trombocita szuszpenziót egészséges donoroktól frissen levett vénás vérből vagy 4-5 napos kórházi trombocita sűrítmenyből állítottunk elő. Mivel jelentős eltérést kísérleteinkben a kétféle módon izolált trombocita preparátumok között nem találtunk, a későbbiekben az előállítást kórházi trombocitákból végeztük. A sűrítmenyből a trombocitákat 1500 g centrifugálással nyertük ki, majd az eredeti térfogatnak megfelelő mosó pufferrel (90 mM NaCl, 5 mM KCl, 36 mM nátrium-citrát, 10 mM EDTA, 5 mM glükóz (pH=6,5)) kétszer mostuk. A mosási lépéseknél a trombocitákat centrifugálással

gyűjtöttük össze (1500 g, 15 perc). A mosott trombocitákat EGTA-t tartalmazó Tyrode's pufferben (140 mM NaCl, 5 mM HEPES, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 5,5 mM glükóz, 1 mM EGTA, 0,36 mM nátrium-foszfát, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM DFP, 0,1 mg/ml leupeptin és 1 mM benzamidin (pH=7,4)) vettük fel 5-10 x 10⁹ trombocita/ml koncentrációnak megfelelően. A fenti lépések mindegyike szobahőmérsékleten történt.

A trombocita szubcelluláris frakciók elkülönítése

A trombocitákat a Tyrode's pufferes szuszpenzióval megegyező térfogatú hideg lízis puffer (100 mM Tris-HCl (pH=7,4), 10 mM EDTA, 2 % Triton X-100, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM DFP, 0,1 µg/ml leupeptin és 1 mM benzamidin) hozzáadásával 5 percig jégen inkubálva tártuk fel. A citoskeletális frakció elválasztásához a trombocita lizátumot centrifugáltuk (10 000 g, 5 perc), majd a pelletet kétszer mostuk az EGTA-t tartalmazó Tyrode's és lízis puffer 1:1 arányú elegyével. A felülúszóból további centrifugálással (100 000 g, 3 óra, 5 °C) választottuk el a membrán frakciót (100 00 g pellet), a 100 000 g felülúszó a citoszol frakciónak felel meg.

Western-blot

SDS-PAGE-t 7,5-20% akrilamidot tartalmazó gradiens vagy 10 % akrilamid koncentrációjú géleken végeztük (Laemmli, 1970). A trombocita citoskeleton és membrán frakciókat kétszeres, a citoszol frakciót hatszoros töménységű SDS minta pufferben 5 percig 100 °C-ra hevítettük, majd a gélre 5-20 µl SDS mintát vittünk fel. A miozin foszfatáz holoenzim esetén a gélre felvitt teljes fehérjemennyiség 2 µg volt. A fehérjéket a gélből nitrocellulóz membránra blotoltuk 250 mA áramerősséggel, 90 percig, folyamatos hűtést alkalmazva. A membrán nem specifikus kötőhelyeinek blokkolására 5 % sovány tejport és 0,1 % Tween 20-at tartalmazó TBS-t (25 mM Tris-HCl (pH=8), 136 mM NaCl, 2 mM KCl) használtunk. Az elsődleges antitestekkel a membránt 60-120 percig, a másodlagos antitestekkel 60 percig inkubáltuk. Az antitesteket 1 % sovány tejport és 0,1 % Tween 20-at tartalmazó TBS-ben oldottuk. Az elsődleges antitestek kimutatására peroxidázzal kapcsolt másodlagos antitesteket, a keresztreakciók detektálásra kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagenst használtunk.

Felülrétegzési kísérletek során a membránokat blokkolás után 2 µg/ml His-PP1cδ-t 0,1 % sovány tejport és 0,1 % Tween 20-at tartalmazó PBS-ben szobahőmérsékleten 120

percig inkubáltuk. A fehérjékhez kötődött His-PP1c δ -t a hexahisztidin peptidre specifikus monoklonális antitesttel mutattuk ki.

A foszforiláció hatása a trombocita citoszkeleton foszfatáz aktivitására

A trombocita citoszkeletont 20 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,25 mM EGTA és 0,25 mM DTT pufferben szuszpendáltuk és ATP hozzáadás nélkül (kontroll), illetve 5 mM Mg²⁺ és 0,5 mM ATP, vagy 0,1-0,5 mM ATP γ S jelenlétében 30 °C-on inkubáltuk. A Rho-kináz inhibitorok hatásának vizsgálatakor a reakcióközeg 10 μ M Y27632-t vagy 10 μ M HA1077-t is tartalmazott. Különböző időpontokban a reakcióelegyből mintát vettünk, amit a kináz reakció leállítására 20 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,1 % 2-merkaptoetanol, 10 mM EDTA és 1 mg/ml BSA pufferben hígítottunk. A foszfatáz aktivitás meghatározáshoz a mintákat tovább hígítottuk a 20 mM Tris-HCl-ot (pH=7,4), 0,1 % 2-merkaptoetanolt és 1 mg/ml BSA-t tartalmazó pufferrel (a minta hússzorosára hígult a foszforiláz foszfatáz, ötvenszeresére P-MLC20 foszfatáz aktivitásmérések esetén). A foszfatáz aktivitást 10 μ M [³²P]-foszforiláz *a* vagy 5 μ M [³²P]-MLC20 szubsztráttal határoztuk meg. A reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítottuk és 10 percig 30 °C-on inkubáltuk. A foszfatáz reakciót (30 μ l reakcióelegy) 200 μ l 10 % TCA hozzáadásával állítottuk le és a fehérjék kicsapásának elősegítésére az elegyhez 200 μ l 1 mg/ml BSA oldatot is adtunk. A kihalászott ³²P_i-ot a kicsapódott fehérjék centrifugálással történő elválasztása után 350 μ l felülúszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A foszfatáz aktivitás változását a kontroll mintákhoz hasonlítva (azt 100 %-nak véve) százalékosan adtuk meg.

GST-MYPT1, GST-MYPT1-C és MLC20 foszforilációja trombocita citoszkeletonális kinázokkal

A trombocita citoszkeletonális frakciót 20 mM Tris-HCl (pH=7,4) 0,25 mM EGTA, 0,1 μ M CL-A, 5 mM Mg²⁺ és 0,1-0,5 mM [γ -³²P]ATP jelenlétében inkubáltuk 0,1 mg/ml GST-MYPT1 jelenlétében vagy távollétében. 30 °C-on 45-60 percig tartó inkubáció után 5-20 μ l mintát P81 foszfocellulóz szűrőpapírra cseppentettünk, a szűrőpapírokat 3x500 ml 0,5 % foszforsavval mostuk. A beépült ³²P mennyiségét a papírok acetonnal történő szárítása után szcintillációs számlálóban határoztuk meg.

Bizonyos esetekben a foszforilációs reakciót tízszeres térfogatú hideg aceton hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet tíz percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk (10 000 g 10 perc). A csapadékot SDS minta pufferben oldottuk, majd a fehérjéket SDS-PAGE

segítségével elválasztottuk. A GST-MYPT1 fehérjébe épült ^{32}P -ot a gélek szárítását követően autoradiográfiával detektáltuk

A GST-MYPT1 Thr695 oldalláncán (gátló foszforilációs hely) bekövetkező foszforiláció kimutatására a trombocita citoszkeleton frakciót 0,1 mg/ml GST-MYPT1 jelenlétében inkubáltuk, a fentiekkel azonos körülmények között $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ helyett, ATP hozzáadásával, 30 °C-on 45 percig. A MYPT1 foszforilációt foszforilált Thr695-re specifikus antitesttel (anti-MYPT1^{pThr695}) mutattuk ki Western-blottal. A GST-MYPT1 (0,1 mg/ml) Rho-kinázzal történő foszforilációját hasonló körülmények mellett végeztük azzal a különbséggel, hogy itt a trombocita citoszkeleton frakciót 50 mU/ml Rho-kinázzal helyettesítettük.

Az SP-Sepharose és MonoQ kromatográfiák során kapott frakciók ILK és ZIP-kináz aktivitását 0,1 mg/ml GST-MYPT1 (0,7 μM), GST-MYPT1-C (1,4 μM) és MLC20 (3,5 μM) jelenlétében határoztuk meg.

MYPT1 és MYPT1 mutánsok foszforilációja

A GST-MYPT1, a GST-MYPT1^{T695A}, a His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, a His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ és a His-MYPT1-C fehérjéket csirke zúzából tisztított ILK-zal (Deng és mtsai, 2001) foszforiláltuk 30 mM Tris-HCl (pH=7,5) 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 85 mM KCl, 1 % Tween 80, 1 μM mikrocisztin-LR, 5 mM Mg^{2+} , és 0,1 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ jelenlétében, 30 °C-on. A beépült ^{32}P mennyiségét 15 μl minta P81 papírra cseppentésével határoztuk meg a korábban leírtak szerint.

A foszforilált MYPT1 mutánsok hatása a PP1c miozin foszfatáz aktivitására

A GST-MYPT1, a GST-MYPT1^{T695A}, a His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ és a His-MYPT1-C fehérjéket ILK-zal (20 % v/v), Rho-kinázzal (50 mU/ml) vagy PKA-val (0,5 $\mu\text{g/ml}$) foszforiláltuk 30 mM Tris-HCl (pH=7,5) 10 mM EGTA, 10 mM DTT, 85 mM KCl, 1 % Tween 80, 5 mM Mg^{2+} , és 0,1 mM ATP γS jelenlétében, 30 °C-on. A foszforilált fehérjék hatását a PP1c (1-5 nM) aktivitásra 5 μM $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-MLC20}$ szubsztráttal határoztuk meg. A defoszforilációt 10 percig 30 °C-on 30 μl térfogatú reakcióközegben végeztük. A foszfatáz reakciót 200 μl 10 % TCA és 200 μl BSA hozzáadásával állítottuk le. A kihasított $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitását a korábban leírtak szerint határoztuk meg.

Kináz aktivitás kimutatása SDS-PAGE után

A trombocita citoszkeletális kinázok molekulatömegének azonosítását Kameshita (1989) módszerének megfelelően végeztük. A 0,02 g mosott trombocitának megfelelő trombocita citoszkeletális fehérjékkel vagy 2 µg miozin foszfatáz holoenzimmel SDS-PAGE-t végeztünk. A hagyományos gélelektroforézissel ellentétben, azonban a fehérjék elválasztását olyan 10 %-os akrilamid gélben végeztük, amelyek polimerizációja szubsztrát fehérjék (100 µg/ml GST-MYPT1-C vagy 100 µg/ml His-MYPT1-C) jelenlétében történt. Kontrollként a szubsztrát fehérjéket nem tartalmazó gélek szolgáltak. A gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket a kinázreakció előtt az alábbiak szerint kezeltük:

1. Az SDS eltávolítására a géleket 2x100 ml 20% 2-propanolt tartalmazó 50 mM Tris-HCl (pH=8) pufferrel 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten.
2. A fehérjék denaturálásához, a gél 2x100 ml 6 M guanidin-HCl-ot és 5 mM 2-merkaptoetanolt tartalmazó 50 mM Tris-HCl (pH=8) pufferben inkubáltuk (1 óra, szobahőmérséklet).
3. A fehérjék renaturálását a gélek 5x200 ml 0,04 % Tween 40-et és 5 mM 2-merkaptoetanolt tartalmazó 50 mM Tris-HCl (pH=8) pufferrel történő mosásával végeztük. (16 óra, 4 °C).

A kináz reakciót megelőzően a gél 0,25 mM EGTA-t és 1 µM CL-A-t tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH=7,4) pufferben 30 percig 30 °C-on előinkubáltuk, és ezt követően a reakciót 0,1 mM [γ -³²P]ATP (500-2000 cpm/pmol) és 5 mM MgCl₂ hozzáadásával indítottuk. A kináz reakciót 60 percig 30 °C-on végeztük majd a géleket 5 % (v/v) TCA-at és 1 % (v/v) nátrium-pirofoszfátot tartalmazó oldatba helyeztük. A nem specifikusan kötődő radioaktív ATP-t a gélek fenti oldattal való mosásával távolítottuk el. A mosást addig végeztük, amíg a mosó folyadék radioaktivitása elérte a háttér aktivitást. A gél 3MM Whatman papíron szárítottuk, és a kináz aktivitást mutató fehérjéket autoradiográfiával detektáltuk.

ZIP-kináz és ILK elválasztása és részleges tisztítása trombocita citoszkeletonból

4 g mosott trombocitából tisztított citoszkeleton frakciót 20 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,25 mM EGTA, 0,25 mM DTT, 0,15 M NaCl és 0,85 M KCl jelenlétében szuszpendáltuk, majd a szuszpenziót ultrahangos kezelésnek vetettük alá. A szuszpenzió centrifugálása (15 000 g, 60 perc) után a pellet és felülúszó frakciókban Bradford módszerrel meghatároztuk a fehérje koncentrációkat, amely szerint a teljes citoszkeletális

fehérjék mintegy 30-50 %-át sikerült a felülúszóban oldható formában kinyernünk. A kapott 2,5 ml felülúszót PD-10 (9,1 ml) sómentesítő oszlopra vittük, amelyet előzetesen puffer A-val (20 mM Tris-HCl (pH=7,4), 0,1 % (v/v) 2-merkaptoetanol, 0,1 mM EGTA, 5 % glicerín és 0.03 % Brij35) ekvilibráltunk. A puffercsere után a citoszkeletális fehérjéket 0,25 ml/perc átfolyási sebességgel puffer A-val előzetesen mosott SP-Sepharose (10 ml) oszlopra vittük. Az oszlopot 75 mM NaCl-ot tartalmazó puffer A-val 1 ml/perc átfolyási sebességgel, 1 ml-es frakciókat szedve mostuk, amíg a 280 nm hullámhosszon detektált abszorbancia 0,05 alá nem csökkent (4-20 frakció). Az oszlophoz kötődő fehérjéket 70 ml lineáris NaCl (0,075-0,6 M puffer A-ban) gradienssel eluáltuk (21-90 frakciók). A frakciók kináz aktivitását 0,1 mg/ml MLC20, GST-MYPT1-C vagy GST-MYPT1 szubsztrátokkal határoztuk meg a 60 perc alatt beépült ^{32}P alapján. Az átfolyó és a NaCl-dal eluált frakciókat Western-blottal is ellenőriztük anti-ILK és anti-ZIP-kináz antitestekkel. Az ILK-t tartalmazó frakciókat (8-13) összegyűjtöttük és 75 mM NaCl-ot tartalmazó puffer A-val ekvilibrált MonoQ (1 ml) oszlopra vittük (0,5 ml/perc átfolyási sebesség). Az oszlopot 10 ml 75 mM NaCl-ot tartalmazó puffer A-val mostuk, majd az oszlophoz kötődött fehérjéket 20 ml lineáris (0,075-1,0 M NaCl puffer A-ban) gradienssel eluáltuk. ILK aktivitást a 0,3-0,5 M NaCl koncentrációnál eluálódó frakciókban mutattunk ki, ahol a fehérje jelenlétét anti-ILK antitesttel végzett Western-blottal is megerősítettük. A ZIP-kinázt tartalmazó SP-Sepharose frakciókat (41-49) MonoQ kromatográfiával szintén tovább tisztítottuk. A kromatográfia előtt az ionerősség csökkentésére Centricon-30-cal végzett puffercserét alkalmaztunk. A ZIP-kináz a MonoQ oszlopról 0,3-0,5 M NaCl koncentrációnak megfelelő ionerősségnél eluálódott.

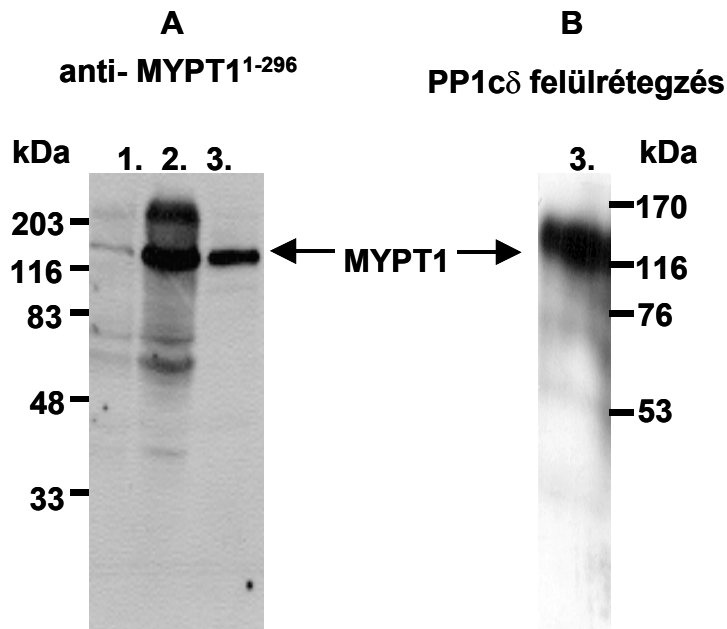
A MYPT1 ILK foszforilációs helyeinek azonosítása

A csirke zúza ILK-zal [$\gamma^{32}\text{-P}$]ATP jelenlétében foszforilált GST-MYPT1, His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ és His-MYPT1-C fehérjéket tripszinnel (0,5 μg) emésztettük, 37 °C-on egy éjszakán keresztül. A foszforilált peptidek C18 fordított fázisú oszlopon történő elválasztását, valamint a tömegspektrometriás méréseket Timothy A. J. Haystead laboratóriumában végezték. A radioaktivitást tartalmazó peptidek szekvenciáit nano-spray technikával QSTAR-Pulsar tömegspektrométerrel határozták meg.

EREDMÉNYEK

A miozin foszfatáz kimutatása trombocita citoszkeletonban

Trombocita szubcelluláris frakciókkal végzett Western-blot kísérletek alapján a citoszkeletális frakció csak PP1 katalitikus alegységet tartalmaz, a PP2A nem mutatható ki (Murányi és mtsai, 1998; Toyoda és mtsai, 1996). Továbbá citoszkeletális frakcióban a miozin foszfatáz aktivitás a meghatározó a foszforilált MLC20 és a foszforiláz *a* szubsztrátokkal végzett aktivitásmérések alapján (Murányi és mtsai, 1998). Ez a miozin specifikus „célra irányító” alegység (MYPT1) jelenlétét feltételezi ebben a frakcióban. Ezzel összhangban trombocita szubcelluláris frakciókkal végzett Western-blottal a MYPT1 jelenlétét a citoszkeletális és membrán frakciókban mutattuk ki, eredményeink szerint a citoszolikus frakció a fehérjét csak alacsony koncentrációban tartalmazza (5/A. ábra). A citoszkeletális fehérjét nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd a membránt His-PP1c δ -val felülrétegeztük. A kötődött PP1c δ -t anti-His-mAb antitesttel detektálva egy 130/133 kDa PP1c-kötő fehérjét mutattunk ki (5/B. ábra), ami megfelelt a MYPT1 molekulatömegének. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a citoszkeletonban a fő foszfatáz komponens a miozin foszfatáz lehet.

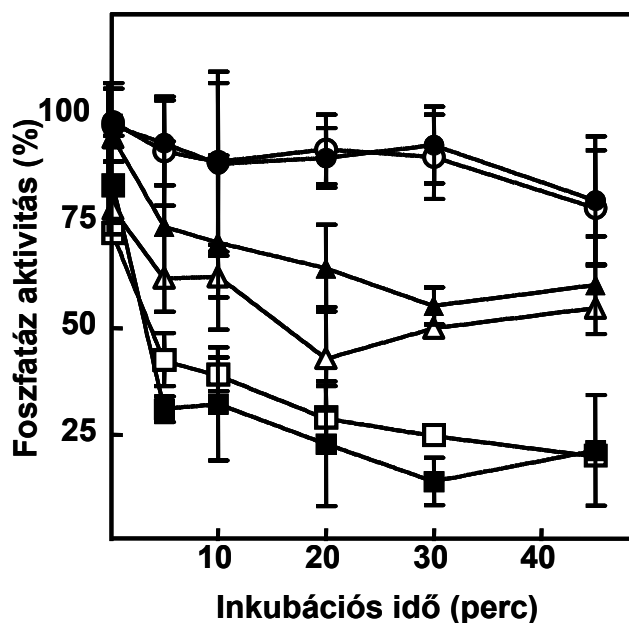


5. ábra A miozin foszfatáz kimutatása trombocita citoszkeletonban

A trombocita szubcelluláris frakciókat SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd a fehérjét nitrocellulóz membránra blotoltuk. **A:** a trombocita szubcelluláris frakciók (1, citoszol; 2, membrán; 3, citoszkeleton) immunreaktivitása anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶-tal. **B:** A citoszkeletális fehérjét tartalmazó membránt His-PP1c δ -val előinkubáltuk, majd a fehérjékhez kötődő His-PP1c δ -t anti-His-mAb antitesttel detektáltuk.

A MgATP és MgATP- γ S hatása a trombocita citoskeleton miozin foszfataz és foszforiláz foszfataz aktivitására

Korábbi kísérletek arra utalnak, hogy a trombocita citoskeleton olyan protein kinázokat tartalmaz, amelyek képesek a MYPT1-et foszforilálni (Murányi és mtsai, 1998). A kináz(ok) típusát, a MYPT1 foszforilációjának hatását a foszfataz aktivitásra, valamint a foszforilálódó aminosavakat azonban még nem ismerjük. Elsőként a foszforiláció hatását tanulmányoztuk a trombocita citoskeleton foszfataz aktivitására foszforilált miozin könnyűlánc ($[^{32}\text{P}]$ -MLC20) és $[^{32}\text{P}]$ -foszforiláz α szubsztráttal. A trombocita citoskeletonot MgATP vagy MgATP- γ S jelenlétében inkubáltuk, amely a frakció miozin foszfataz és foszforiláz foszfataz aktivitás csökkenését eredményezte. MgATP hatására 45 perc inkubálási idő alatt a foszfataz aktivitás mindkét szubsztráttal 40-55%-kal csökkent. Ennél nagyobb mértékű, 80-90%-os aktivitás csökkenés volt tapasztalható, amikor MgATP γ S-t használtunk (6. ábra). Az eltérés valószínű magyarázata az, hogy a MgATP γ S jelenlétében a fehérjébe tiofoszfát épül be, amelyet a foszfatazok nem képesek kihasítani. Ezért a miozin foszfataz általi autodefoszforiláció, illetve más endogén citoskeletonális foszfatazzal történő defoszforiláció nem játszódik le és a MYPT1 foszforilációja és a foszfataz aktivitás gátlása fenntartott marad.



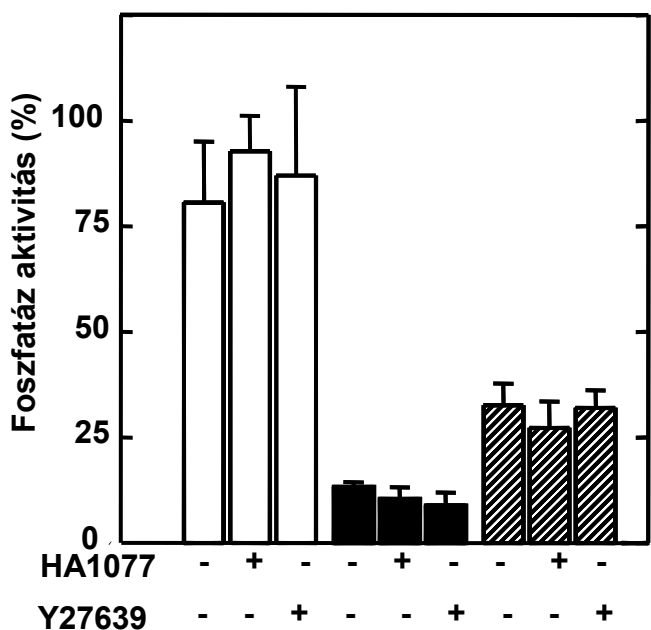
6. ábra A trombocita citoskeleton foszfataz aktivitás gátlása MgATP ill. MgATP γ S hatására A trombocita citoskeleton szuszpenziót 30 °C-on inkubáltuk ATP hozzáadása nélkül (○, ●), 5 mM MgCl₂ és 0,5 mM ATP (△,▲), valamint 5 mM MgCl₂ és 0,5 mM ATP γ S (□,■) jelenlétében, majd meghatároztuk a foszforilációs reakciókból különböző időpontban vett minták foszfataz aktivitását $[^{32}\text{P}]$ -MLC20 (●,▲, ■) és $[^{32}\text{P}]$ -foszforiláz α (○,△,□) szubsztrátokkal.

A fenti eredmények olyan foszforilációs folyamatok lejátszódására utalnak, amelyek közvetlen vagy közvetett úton a miozin foszfatáz aktivitás gátlását eredményezik. A miozin foszfatáz foszforilációval történő szabályozásában a Rho-kináz (Feng és mtsai, 1999), a MDPK (myotonic dystrophy kinase) (Murányi és mtsai, 2001), a 32 kDa ZIP-kináz (MacDonald és mtsai, 2001a) és a Raf-1 kináz (Broustas és mtsai, 2002) szerepét írták le, amelyek a MYPT1 alegységet a gátló (Thr695) foszforilációs helyen foszforilálják. A miozin foszfatáz gátlása közvetett úton is megvalósulhat, a CPI-17 inhibitor fehérje foszforilációján keresztül PKC (Senba és mtsai, 1999), Rho-kináz (Kitazawa és mtsai, 2000; Koyama és mtsai, 2000), 32 kDa ZIP-kináz (MacDonald és mtsai, 2001b) és PKN (Hamaguchi és mtsai, 2000) enzimek által. A CPI-17-et trombocitákban is kimutatták (Watanabe és mtsai, 2001). Trombocita citoszkeletonban azonban a CPI-17-t Western-blottal nem detektáltuk (nem bemutatott eredmény), ezért feltételezzük, hogy a MgATP, ill. a MgATP γ S által kiváltott foszfatáz aktivitás csökkenésben tehát a MYPT1 fehérje foszforilációjának lehet szerepe.

Rho-kináz inhibitorok hatása a MgATP γ S hatására bekövetkező, foszfatáz aktivitás csökkenésre

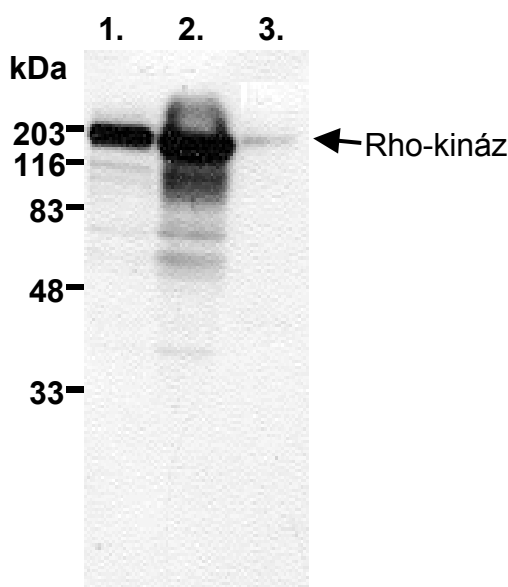
A miozin foszfatázt foszforiláló kinázok közül a Rho-kináz szerepét a MYPT1 foszforilációjában trombocitában is jellemezték. Ezért specifikus Rho-kináz inhibitorok (Y27632 vagy HA1077) alkalmazásával tanulmányoztuk, hogy ezek befolyásolják-e a MgATP γ S hatására bekövetkező foszfatáz aktivitás gátlást. 10 μ M Y27639 vagy 10 μ M HA1077 nem befolyásolta a 0,5 mM MgATP γ S jelenlétében kialakuló foszfatáz aktivitás gátlást (7. ábra). Mivel a kináz inhibitorok hatásmechanizmusa a MgATP szubsztráttal való kompetíción alapul, az Y27632 és a HA1077 hatását megvizsgáltuk alacsonyabb MgATP γ S koncentráció mellett is. A MgATP γ S alacsonyabb, 0,1 mM koncentrációban való alkalmazása a foszfatáz aktivitás gátlásának mértékét kismértékben csökkentette (a 0,5 mM MgATP γ S-hez viszonyítva), de a Rho-kináz inhibitorok ebben az esetben is hatástalannak bizonyultak (7. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a trombocita citoszkeletonban a miozin foszfatáz gátló foszforilációját Rho-kináztól eltérő protein kinázok katalizálják. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy a Rho-kináz a trombocita citoszkeletonban nincs, vagy csak nagyon alacsony koncentrációban van jelen. A trombocita szubcelluláris frakciók Rho-kinázra specifikus antitesttel végzett Western-blot

vizsgálata szerint ugyanis a Rho-kináz elsősorban a citoskeletális és a membrán frakcióban lokalizálódik (8. ábra).



7. ábra Rho-kináz inhibitorok hatása a MgATP γ S jelenlétében bekövetkező foszfátáz aktivitás gátlásra

A trombocita citoskeleton szuszpenziót 30 °C-on, 45 percig inkubáltuk ATP hozzáadása nélkül (üres oszlopok) vagy 5 mM MgCl₂ és 0,5 mM ATP γ S (sötét oszlopok), valamint 5 mM MgCl₂ és 0,1 mM ATP γ S (csíkozott oszlopok) jelenlétében, Rho-kináz inhibitor hozzáadásával (+) és anélkül (-), majd meghatároztuk a foszfátáz aktivitást [³²P]-MLC20 szubsztráttal.

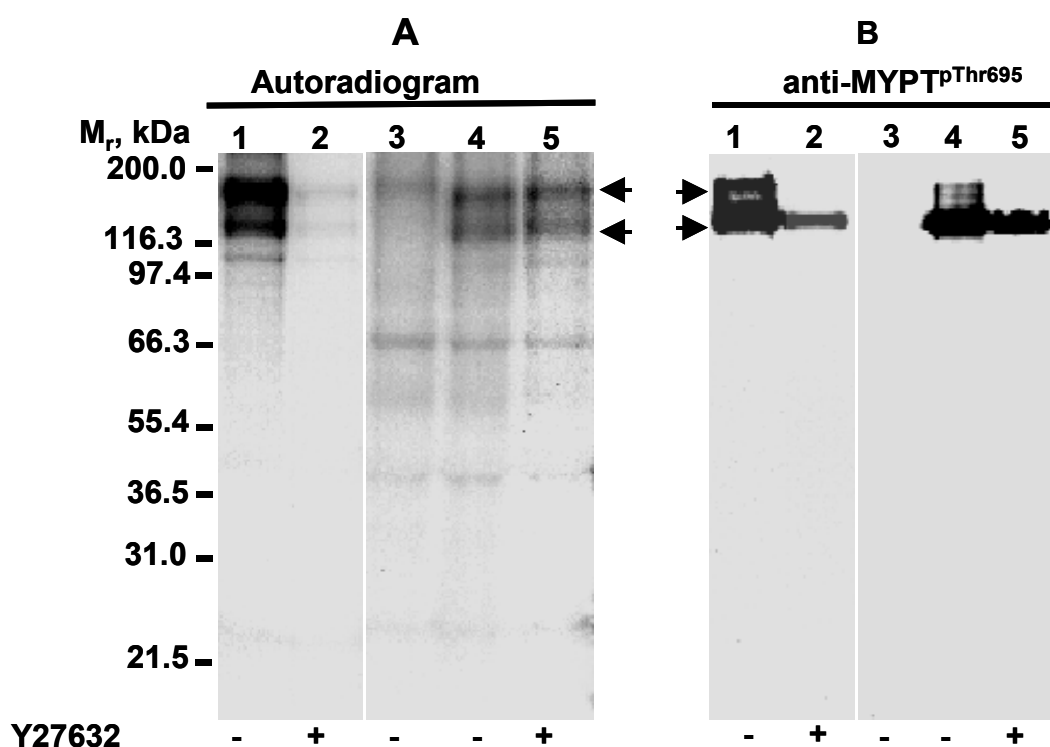


8. ábra A Rho-kináz kimutatása trombocita szubcelluláris frakciókban

A trombocita szubcelluláris frakciók (1, citoszol; 2, membrán; 3, citoskeleton) immunreaktivitása Rho-kinázra specifikus poliklonális antitesttel.

A MYPT1 foszforilációja trombocita citoskeletális kinázokkal a gátló helyen (Thr695)

A trombocita citoskeletonban bekövetkező miozin foszfataz aktivitás gátlás mechanizmusának tanulmányozásához megvizsgáltuk, hogy vajon a gátló helyen következik-e be a MYPT1 foszforilációja a citoskeletális kinázokkal. Szubsztrátként rekombináns GST-MYPT1 fehérjét használtunk. A foszforilációt endogén citoskeletális kinázok mellett, Rho-kináz inhibitor (Y27632) jelenlétében vagy távollétében végeztük. Kontrollként a GST-MYPT1 fehérjét Rho-kinázzal is foszforiláltuk.



9. ábra A GST-MYPT1 foszforiláció összehasonlítása Rho-kinázzal és trombocita citoskeletális kináz(ok)kal

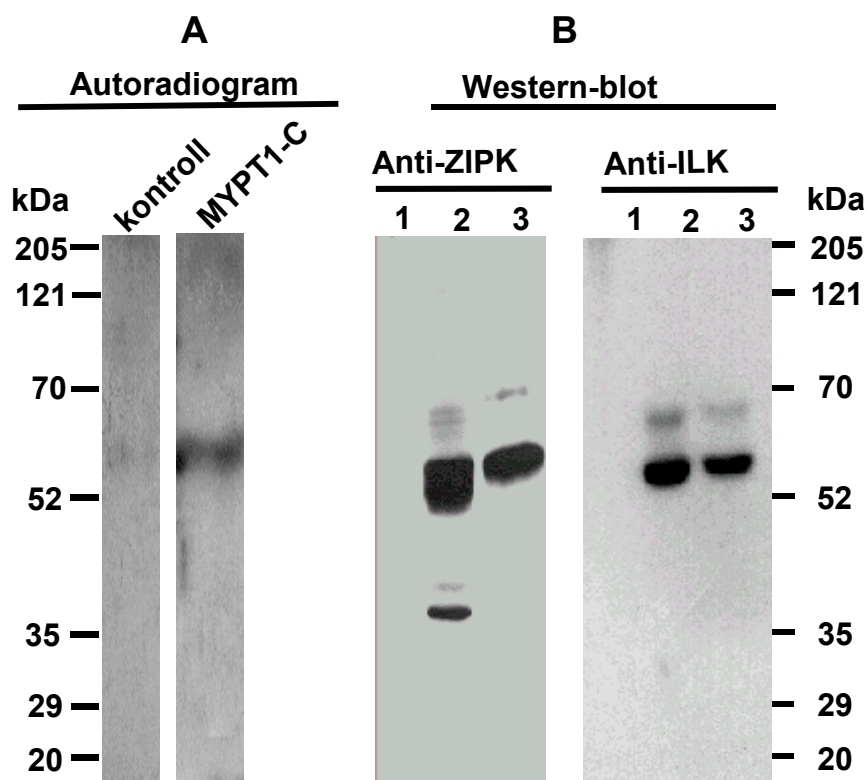
A GST-MYPT1 fehérjét Rho-kinázzal (1., 2. oszlop) vagy, trombocita citoskeletális kináz(ok)kal (4., 5. oszlop) foszforiláltuk Rho-kináz inhibitor (10 μ M Y27632) jelenlétében (+) vagy távollétében (-). A 3. oszlop a citoskeletális fehérjék foszforilációja citoskeletális kinázokkal GST-MYPT1 szubsztrát hozzáadása nélkül. **A:** a reakciót 0,1 mM [γ^{32} P]ATP (1000 cpm/pmol) hozzáadásával indítottuk 45 perc reakcióidő után a fehérjéket SDS-PAGE-sel elválasztottuk és a radioaktív fehérjéket autoradiográfiával azonosítottuk. **B:** a 0,5 mM ATP-t tartalmazó reakció elegyeket hasonló módon kezeltük, azonban a fehérjéket SDS-PAGE után nitrocellulóz-membránra transzferáltuk, majd a Thr695 oldallánc foszforilációját anti-MYPT1^{pThr695} antitesttel mutattuk ki.

A 9/A ábrán látható autoradiogrammon a két radioaktív fehérje sáv megjelenése jelzi, hogy a GST-MYPT1 a Rho-kinázzal és a trombocita citoskeletális kináz(ok)kal is foszforilálódott. A kisebb molekulatömegű sáv valószínűleg a GST-MYPT1 proteolitikus lebomlási terméke. A GST-MYPT1 foszforilációját az Y27632 inhibitor csak a Rho-kináz

esetében gátolta jelentősen. A Rho-kináz a MYPT1-et a gátló foszforilációs helyen foszforilálja és ez a miozin foszfatáz aktivitás csökkenését eredményezi (Feng és mtsai, 1999). Az endogén citoskeletális kináz(ok) szintén a Thr695 aminosav foszforilációján keresztül gátolják a miozin foszfatáz aktivitást. A citoskeletális kinázokkal foszforilált GST-MYPT1 a gátló foszforilációs helyre specifikus antitesttel (anti-MYPT1^{pThr695}) keresztreakciót adott (9/B. ábra), amelynek jelerősségében az Y27632 jelenlétében csak kismértékű változást tapasztaltunk. Ez korábbi adatainkkal összhangban arra utal, hogy a citoskeletális kinázok a Rho-kináztól különböznek, hatásmechanizmusuk azonban hasonló, mivel szintén a Thr695 oldallánc foszforilációja által gátolják a miozin foszfatáz aktivitást.

A trombocita citoskeletonhoz asszociálódó kinázok azonosítása

A trombocita citoskeletális fehérjét SDS-PAGE-sel elválasztottuk olyan gélben, amelyet a MYPT1 C-terminális (667-1004 aminosavak) szakaszát tartalmazó szubsztrát fehérje (GST-MYPT-C) jelenlétében polimerizáltunk. A citoskeletális fehérjék renaturálása után a gél Mg[$\gamma^{32}\text{P}$]ATP-vel inkubáltuk, majd a beépült radioaktív foszfátot autoradiográfiával detektáltuk. Az autoradiogrammon látható sáv MYPT1-et foszforiláló kináz(ok)nak felel meg és jelzi ezen kináz(ok) látszólagos molekulatömegét (10/A. ábra). A trombocita citoskeletonban kimutatott kb 54-59 kDa molekulatömegnek megfelelő sáv, hasonló molekulatömegű, a GST-MYPT1-C-t foszforilálni képes MYPT1 kináz(ok) jelenlétére utal a trombocita citoskeletonban. A kontroll, hozzáadott szubsztrátot nem tartalmazó gél esetén kináz aktivitást nem tapasztaltunk. Irodalmi adatokból ismert, hogy az 52-54 kDa ZIP-kináz (Niiró és mtsai, 2001; Murata-Hori és mtsai, 1999) és az 59 kDa ILK (Deng és mtsai, 2001) a miozinban a MLC20-ot foszforilálja, továbbá a 32 kDa ZIP-kináz képes a MYPT1-et a gátló foszforilációs helyen foszforilálni (MacDonald és mtsai, 2001a). Ezért anti-ZIP-kináz és anti-ILK antitestekkel megvizsgáltuk a ZIP-kináz és ILK jelenlétét a trombocita citoskeletonban. 10/B. ábrán bemutatott Western-blot alapján a ZIP-kináz és az ILK a trombocita citoskeleton és membrán frakciókban mutatható ki. A membrán frakcióban ZIP-kináz antitesttel megjelenő 38 kDa sáv pedig valószínűleg 32 kDa ZIP-kinázhoz hasonló fehérjével történő keresztreakció eredménye. Mivel a gélben végzett kináz aktivitásméréssel meghatározott kinázok molekulatömege jó egyezést mutat a Western-blottal kimutatott ZIP-kináz és ILK látszólagos molekulatömegével, feltételeztük, hogy ezeknek a kinázoknak szerepük lehet a miozin foszfatáz trombocita citoskeletonban megfigyelt foszforilációjában.



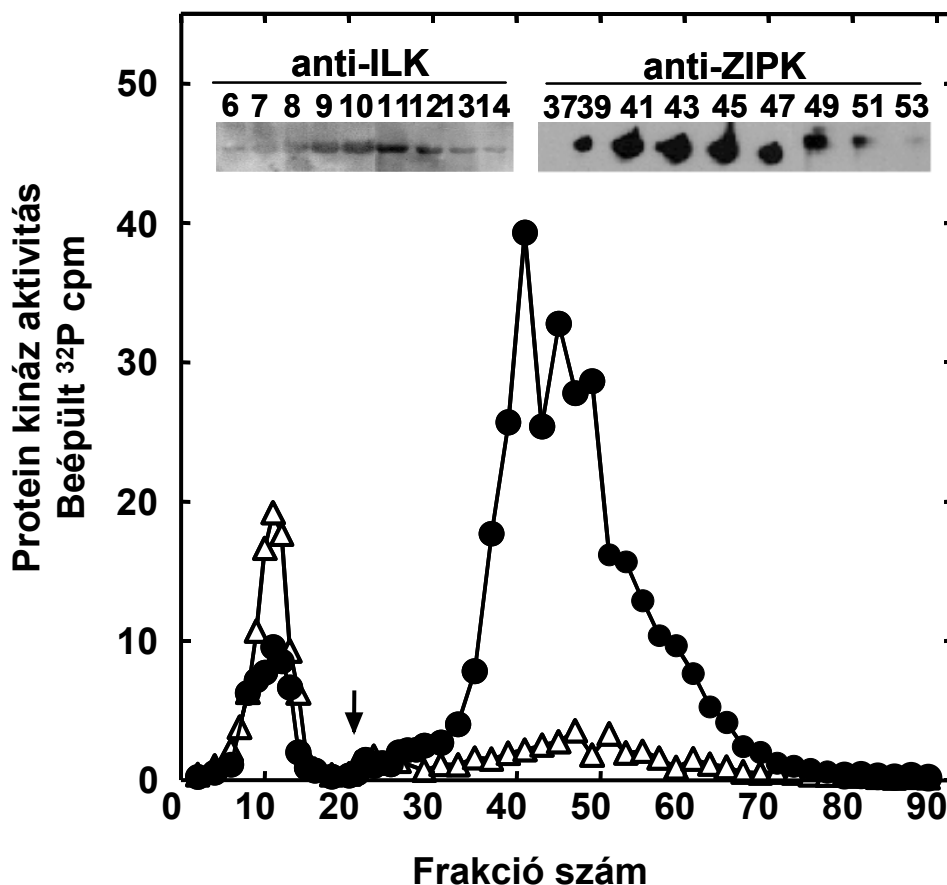
10. ábra A trombocita citoszkeletonhoz asszociálódott MYPT1 kinázok azonosítása

A: A trombocita citoszkeletális fehérjét SDS-PAGE segítségével választottuk el GST-MYPT1-C jelenlétében és távollétében (kontroll) polimerizált SDS-poliakrilamid géleken. A gél a „Módszerek” fejezetben leírtak szerint kezeltük, majd a foszforilációs reakciót 0,1 mM [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (1000 cpm/pmol) és 5 mM MgCl_2 jelenlétében 30 °C-on, 60 percig végeztük. Az ATP feleslegének eltávolítása után a fehérjékhez kovalensen kötött ^{32}P -ot autoradiográfiával detektáltuk. B: A trombocita szubcelluláris frakciók (1, citoszol; 2, membrán; 3, citoszkeleton) Western-blotot analízise ZIP-kinázra és ILK-ra specifikus poliklonális antitestekkel.

ILK és ZIP-kináz elválasztása trombocita citoszkeletonból SP-Sepharose kromatográfiával

További célunk volt a trombocita citoszkeletonnal asszociálódó ILK és ZIP-kináz részleges tisztítása, hogy szerepüket tovább vizsgáljuk a miozin és a MYPT1 foszforilációban. A trombocita citoszkeletális fehérjét 0,85 M KCl jelenlétében részlegesen oldható formába hoztuk, majd egy PD-10 oszlopon történő puffercsere után SP-Sepharose kromatográfiával elválasztottuk. A frakciók kináz aktivitását MLC20 és GST-MYPT1-C szubsztrátokkal vizsgáltuk. Az átfolyó frakciókban MLC20 és GST-MYPT1-C kináz aktivitást is kimutattunk (11. ábra) és ezek a frakciók anti-ILK antitesttel pozitív keresztreakciót adtak (11. ábra, bal oldali blot), anti-ZIP-kináz antitesttel viszont nem mutattak immunreaktivitást (nem bemutatott eredmény). Az SP-Sepharose-hoz kötődött fehérjét 0,075-0,6 M NaCl gradienssel eluáltuk és a frakciókban alacsony GST-

MYPT1-C kináz aktivitás mellett elsősorban MLC20 kináz aktivitást mutattunk ki (11. ábra). Western-blottal a 41-49 frakciókban azonosítottuk a ZIP-kinázt (11. ábra jobb oldali blot), míg ezekben a frakciókban az ILK-zal immunreaktivitást nem tudtunk kimutatni. (nem bemutatott eredmény). Az SP-Sepharose kromatográfiával tehát sikerült az ILK és ZIP-kinázokat egymástól elválasztani. Az átfolyó frakcióban mért jelentős GST-MYPT1-C kináz aktivitás alapján pedig arra következtetünk, hogy elsősorban az ILK-nak lehet szerepe a MYPT1 foszforilációjában.



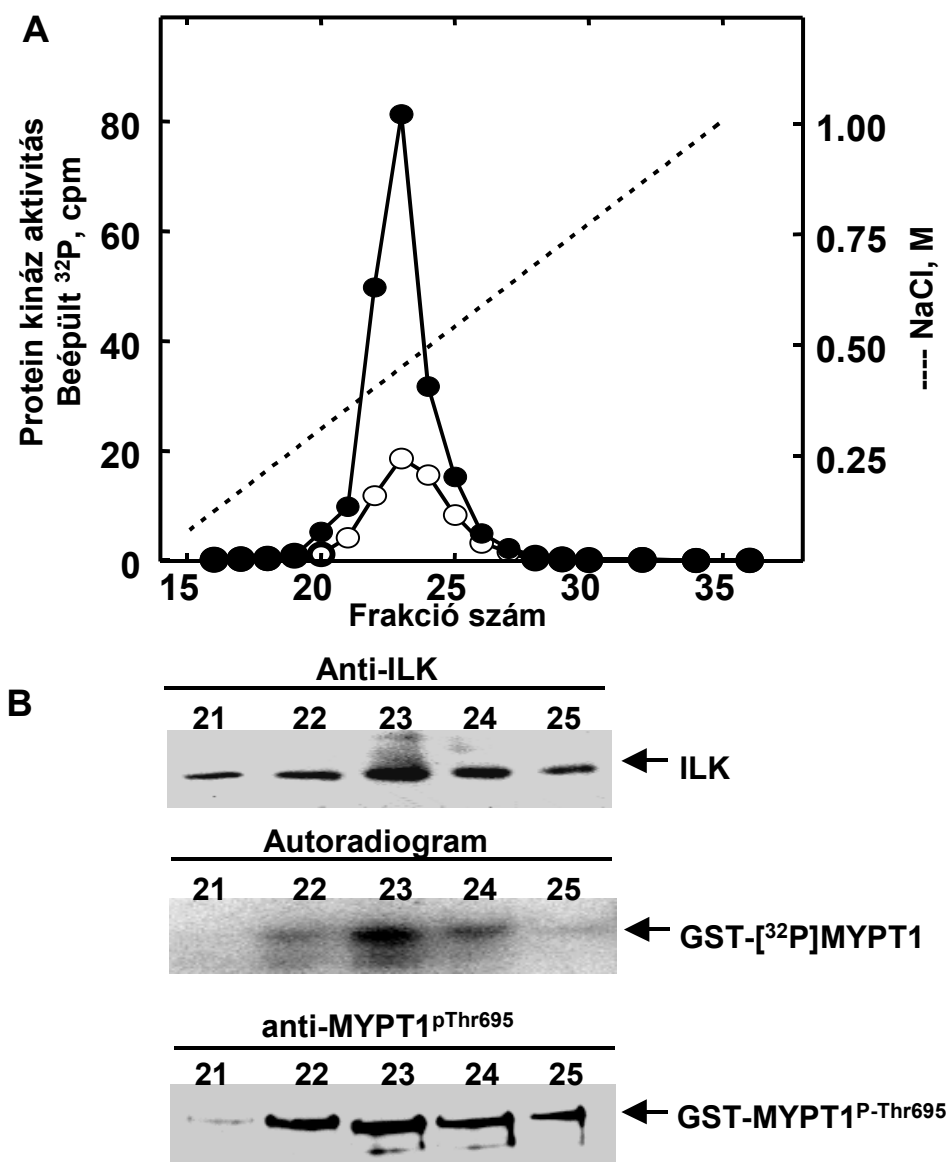
11. ábra ILK és ZIP-kináz elválasztása trombocita citoszkeletonból SP-Sepharose kromatográfiával

Trombocita citoszkeletális fehérjét (3 ml) SP-Sepharose oszlopra vittünk (1 ml/perc átfolyási sebesség), majd az oszlop 0,075 M NaCl-dal történő mosása után (4-20 frakciók) a kötődő fehérjét 0,075-0,6 M lineáris NaCl gradienssel eluáltuk (a nyíl a 70 ml-es gradiens kezdetét jelzi). Az átfolyó és kötődő frakcióban a kináz aktivitást MLC20 (3,5 μ mol) (●) és GST-MYPT1-C (1,4 μ mol) (Δ) szubsztráttal határoztuk meg. Bal oldali inzert: az átfolyó frakciók immunreaktivitása anti-ILK antitesttel (Western-blot); Jobb oldali inzert: NaCl gradiens elúcióval kapott frakciók immunreaktivitása (Western-blot) anti-ZIP-kináz antitesttel

A GST-MYPT1 foszforilációja trombocita citoszkeleton ILK-zal

A trombocita citoszkeletonból elválasztott ILK-t tovább tisztítottuk. Az SP-Sepharose oszlopon átfolyó ILK-t tartalmazó frakciókat MonoQ oszlopra vittük fel, majd a

kötődő fehérjéket NaCl gradienssel eluáltuk (12/A. ábra). A frakciók kináz aktivitásának változása, MLC20 és GST-MYPT1 szubsztrátokkal (12/A. ábra), jó egyezést mutatott a Western-blottal detektált ILK mennyiségével (12/B. ábra felső blot). Az ILK-t tartalmazó frakciókhoz GST-MYPT1 szubsztrátot használva, anti-MYPT1^{pThr695} antitesttel végzett Western-blot során a MYPT1 gátló foszforilációját is kimutattuk (12/B. alsó blot).



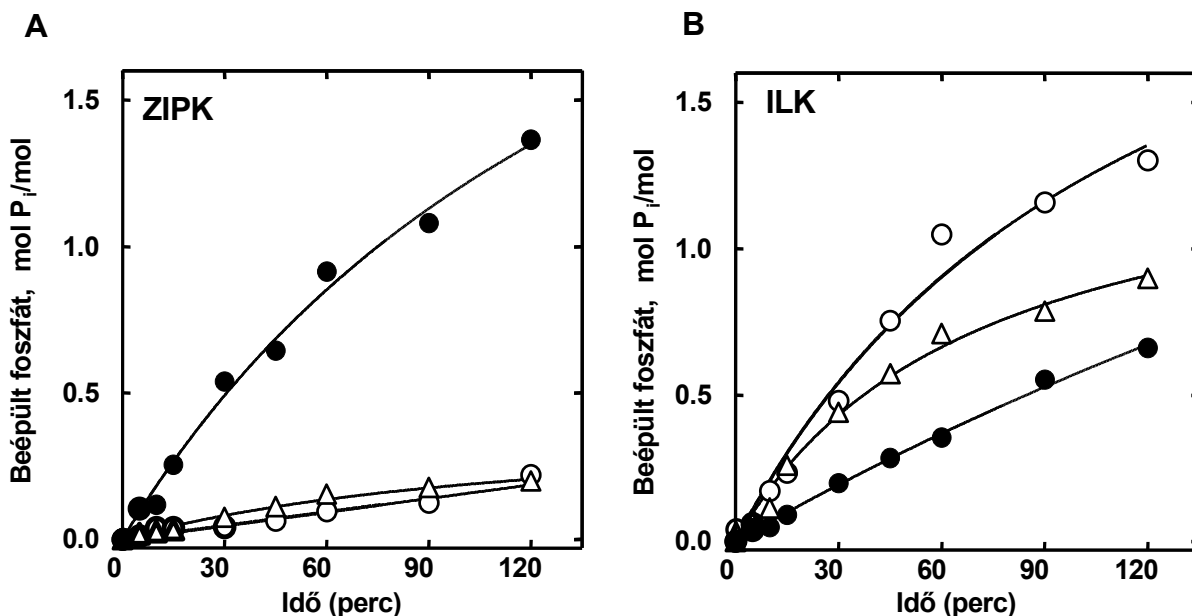
12. ábra A GST-MYPT1 foszforilációja MonoQ oszlopon tisztított ILK-zal

A: Az SP-Sepharose kromatográfiával kapott ILK-t tartalmazó frakciókat (8-13 frakciók) egyesítettük, majd 1 ml térfogatú MonoQ oszlopra vittük. Az oszlopot 0,075 M NaCl-ot tartalmazó puffer A-val mostuk, majd a kötődött fehérjéket 0,075-1M NaCl lineáris gradienssel (20 ml) eluáltuk (átfolyási sebesség: 0,5 ml/perc). A frakcióban a kináz aktivitást MLC20 (3,5 μ mol) (●) és GST-MYPT1 (0,7 μ mol) (○) szubsztráttal detektáltuk. A szaggatott vonal a NaCl koncentrációt jelzi az elúció során. B: *felső blot*: a 21-25 frakciók Western-blot analízise anti-ILK antitesttel; *középső blot*: a 21-25 frakciók által foszforilált GST-MYPT1 autoradiogrammja; *alsó blot*: a 21-25 frakciók által foszforilált GST-MYPT1 Western-blot analízise anti-MYPT1^{pThr695} antitesttel.

Hasonló módon az SP-Sepharose-hoz kötődő, ZIP-kinázt tartalmazó frakciókat is tovább tisztítottuk MonoQ kromatográfiával. Ennek során a kötődő frakcióban főleg MLC20 aktivitást mutattunk ki alacsony MYPT1 kináz aktivitás mellett (nem bemutatott eredmény).

MLC20, GST-MYPT1 és GST-MYPT1-C foszforilációja ZIP-kinázzal és ILK-zal

A MonoQ kromatográfia után kapott részlegesen tisztított ZIP-kináz és ILK enzimekkel MLC20, GST-MYPT1 és GST-MYPT1-C szubsztrátokat foszforiláltunk. A ZIP-kináz 1,4 mol/mol foszfát beépülését katalizálta a MLC20-ba, amely korábbi eredmények alapján (Niiró és mtsai, 2001; Murata-Hori és mtsai, 1999) a Ser19 és Thr 18 aminosavak foszforilációjának következménye lehet. A ZIP-kináz a GST-MYPT1 és a GST-MYPT1-C szubsztrátokat csak kismértékben ($< 0,2$ mol P/mol) foszforilálta (13/A. ábra). Az ILK mindhárom szubsztrátot foszforilálta, de a MLC20-ot a ZIP-kináznál kisebb sebességgel és kisebb mértékben (13/B. ábra). Az ILK a GST-MYPT1 szubsztrátba 1,4 mol/mol, GST-MYPT1-C szubsztrátba 1 mol/mol foszfát beépülését katalizálta (13/B. ábra). Ez arra utal, hogy a gátló foszforilációs hely (Thr695) mellett a MYPT1-ben az ILK más oldalláncokat is foszforilálhat. Az enzimkinetikai adatok tehát megerősítették az ILK szerepét a MYPT1 foszforilációban, továbbá arra utalnak, hogy a ZIP-kináz inkább a miozin foszforilációért lehet felelős.

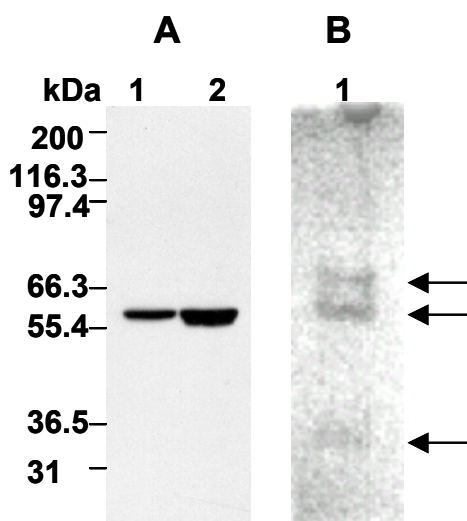


13. ábra MLC20, GST-MYPT1 GST-MYPT1-C foszforilációja ZIP-kinázzal és ILK-zal
Az MLC20 (●), GST-MYPT1(○), GST-MYPT1-C (△) fehérjék foszforilációja ZIP-kináz (A) és ILK (B) enzimekkel. A kináz preparátumokat a MonoQ kromatográfia csúcsfrakcióiból nyertük.

Az ILK asszociációja a miozin foszfatázzal

A trombocita citoszkeleton frakcióval végzett kísérletek az ILK szerepét vetik fel a miozin foszfatáz gátlásában. Az ILK-on keresztül megvalósuló miozin foszfatáz szabályozás mechanizmusának pontosabb megismeréséhez tisztított simaizom miozin foszfatáz és ILK preparátumokat használtunk.

Régóta ismert, hogy a simaizom miozin foszfatáz holoenzim preparátum tartalmaz a MYPT1-et foszforiláló kinázokat (Ichikawa és mtsai, 1996). Ezek egyike lehet pl. a 32 kDa ZIP-kináz, amelyről kimutatták, hogy képes a MYPT1-et a gátló helyen foszforilálni (MacDonald és mtsai, 2001a). Anti-ILK antitesttel végzett Western-blottal kimutattuk, hogy a pulyka zúzából preparált miozin foszfatáz holoenzim tartalmaz ILK-t (14/A. ábra). Az antitest által felismert fehérje mérete megegyezik a tisztított ILK-nak (Deng és mtsai, 2001) megfelelő 59 kDa molekulatömeggel. His-MYPT1-C-t használva szubsztrátként SDS-PAGE-t követő kinázreakció során a miozin foszfatáz holoenzimmal asszociálódó 59 kDa endogén kináz jelenlétét is kimutattuk. A 14/B. ábrán bemutatott autoradiogramm alapján arra következtethetünk, hogy a miozin foszfatáz holoenzimben legalább három olyan kináz található, amely a His-MYPT1-C-t foszforilálja.



14. ábra Az ILK asszociációja a miozin foszfatázzal

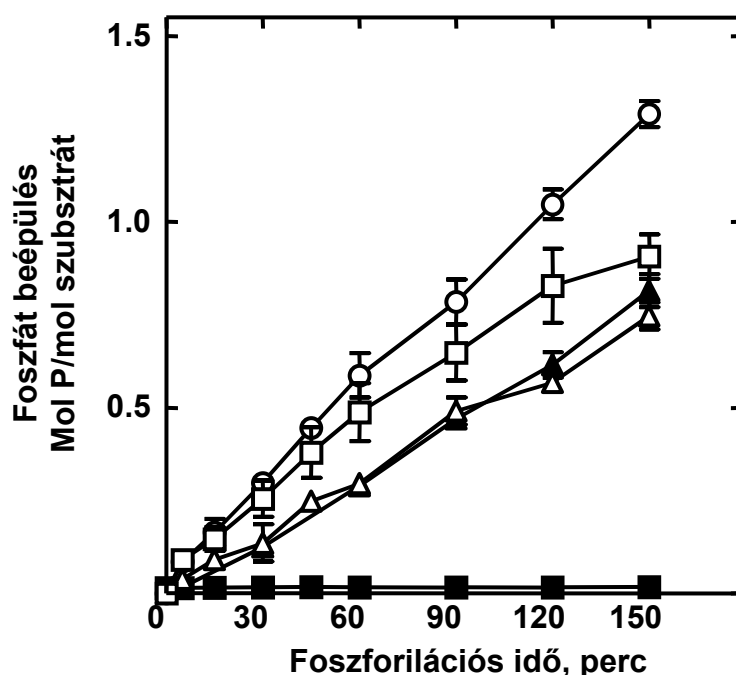
A: Western-blot anti-ILK antitesttel: 1, miozin foszfatáz holoenzim; 2, tisztított ILK B: A miozin foszfatáz holoenzimben lévő fehérjéket (2µg) SDS-PAGE segítségével választottuk el 100 µg/ml His-GST-MYPT1-C jelenlétében polimerizált géleken, majd a fehérjéket a gélben renaturáltuk. A kináz reakciót 100µCi [γ ³²P]ATP hozzáadásával indítottuk és 30 °C-on 90 percig inkubáltuk. A His-MYPT1-C fehérjébe beépült ³²P-ot autoradiográfiával detektáltuk

Az 59 kDa kináz megfelel az ILK-nak, a kb. 35 kDa kináz feltehetően a korábban már azonosított 32 kDa ZIP-kináz (MacDonald és mtsai, 2001a). Előzetes eredményeink

szerint pedig a 70 kDa kináz a cGMP-függő protein kináz egyik izoformájára specifikus antitesttel adott adott keresztreakciót. Eredményeink arra utalnak, hogy az ILK számos kromatográfiás lépés után is a miozin foszfatáz holoenzimmel erősen asszociálva marad.

A GST-MYPT1 illetve MYPT1 mutánsok foszforilációja ILK-zal

A MYPT1 ILK által foszforilált régióinak meghatározásához, különböző MYPT1 mutánsokat foszforiláltunk zúzából tisztított ILK-zal és vizsgáltuk a foszforiláció mértékét (15. ábra). A GST-MYPT1 esetén a foszforiláció 150 perc alatt 1,3 mol P/mol értéket ért el, és ezt a gátló foszforilációs hely pontmutációja (GST-MYPT1^{T695A}) csak kismértékben csökkentette (1 mol P/mol-ra), amelyből arra következtetünk, hogy a Thr695 oldalláncon kívül más oldalláncon is foszforilálódnak a fehérjében. Az ILK szintén foszforilálta az 1-511 aminosav maradéknak megfelelő N-terminális peptidszakaszt (MYPT1¹⁻⁵¹¹) 0,8 mol P/mol mértékig. Ezzel szemben a 1-296 aminosavaknak megfelelő MYPT1 peptidszakasz (MYPT1¹⁻²⁹⁶) foszforilációja nem játszódtott le, ami arra utal, hogy az N-terminális foszforilációs hely a 296-511 szakaszon helyezkedik el. A fehérje C-terminális felét (His-MYPT1-C) az ILK szintén 0,8 mol P/mol mértékben foszforilálta (15. ábra).



15. ábra A MYPT1 és MYPT1 mutánsok foszforilációja ILK-val

A GST-MYPT1 (○), GST-MYPT1^{T695A} (□), His-MYPT1-C (△), His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ (▲), His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (■) foszforilációja ILK-zal. A szubsztrátkoncentráció mindegyik fehérje esetén 100 µg/ml volt

A MYPT1 ILK foszforilációs helyeinek azonosítása

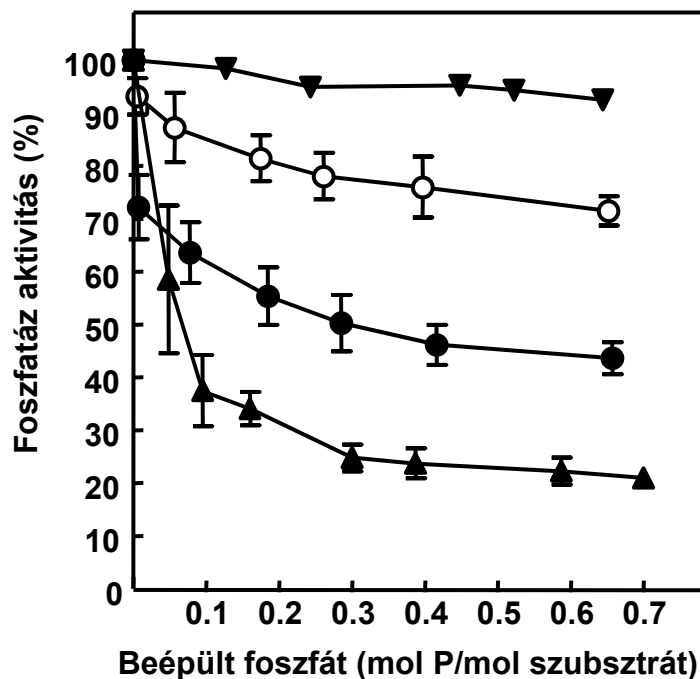
A foszforiláció pontos helyének meghatározásához ILK-zal foszforilált ^{32}P -jelzett GST-MYPT1, His-MYPT1-C, és His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ fehérjéket állítottunk elő, amelyeket tripszinnel emésztettünk. A foszforilációs helyek analízisét Dr. Timothy Haystead laboratóriumában (Duke University) végezték. A foszforilált peptideket HPLC technikával választották el, a radioaktív csúcsok azonosítása után a peptidek szekvenciáját nano-spray MS technika alkalmazásával határozták meg. Ezek alapján azonosították a Thr709, a Thr695 valamint a Thr495 foszforilált oldalláncokat. A foszforilációs helyek meghatározásának eredményeit az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

Emésztett fehérje	Kiválasztott peptid	Peptid szekvencia	Foszforilációs hely
GST-MYPT1, His-MYPT1-C	C3	⁶⁹⁴ STQGVTLTDLQEAEK(pT)IGR ⁷¹²	Thr709
GST-MYPT1	C1	⁶⁹³ RS(pT)QGVTLTDLQEAEK ⁷⁰⁸	Thr695
His-MYPT1 ¹⁻⁵¹¹	N1	⁴⁹⁰ AYVAP(pT)IPR ⁴⁹⁸	Thr495

Különböző kinázokkal foszforilált MYPT1 hatása a PP1c aktivitására

GST-MYPT1, GST-MYPT1^{T695A} fehérjéket ILK, Rho-kináz és PKA enzimekkel tiofoszforiláltunk és vizsgáltuk a foszforilált MYPT1 fehérjék hatását a PP1c aktivitására a MYPT1-be beépülő foszfát mennyiség függvényében, állandó GST-MYPT1 koncentráció mellett (16. ábra). A Rho-kinázzal történő MYPT1 tiofoszforiláció (az irodalmi adatoknak megfelelően (Feng és mtsai, 1999)) a PP1c aktivitás gátlását eredményezte viszonylag kismértékű foszforiláció esetén is (az eredeti aktivitást 80 %-kal csökkentette). A PKA a MYPT1-et nem a gátló foszforilációs helyen foszforilálja, ezzel összhangban nem gátolja a miozin foszfatáz aktivitást sem (Nakamura és mtsai, 1999). Ennek megfelelően a kontrollként használt PKA-val foszforilált GST-MYPT1 nem okozott gátlást kísérleteinkben sem (16. ábra). A GST-MYPT1 ILK-zal történő tiofoszforilációja jelentősen csökkentette (60 %-kal) a PP1c aktivitását, habár ez a gátlás nem érte el a Rho-kináz esetén tapasztalt mértéket. A gátlás mértéke kevesebb mint 30 % volt, amikor a gátló foszforilációs helyen pontmutációt tartalmazó GST-MYPT1^{T695A} ILK által tiofoszforilált formájának hatását vizsgáltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a MYPT1 ILK-zal katalizált foszforilációja esetén a Rho-kinázhoz hasonlóan a foszfatáz aktivitás gátlásának meghatározó feltétele a Thr695 oldallánc foszforilációja.



16. ábra A MYPT1 különböző kinázok által katalizált tiofoszforilációjának hatása a PP1c aktivitásra

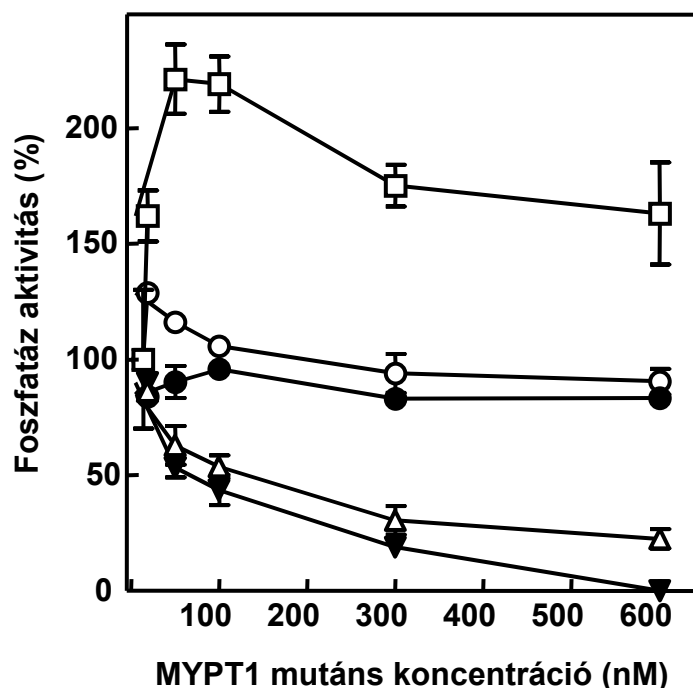
Rho-kináz által tiofoszforilált GST-MYPT1 (▲) ILK által tiofoszforilált GST-MYPT1 (●) és GST-MYPT1^{T695A} (○) valamint PKA-val tiofoszforilált GST-MYPT1 (▼) hatását vizsgáltuk 5 nM koncentrációban a PP1c (5nM) aktivitásra 5 μ M [³²P]-MLC20 szubsztráttal.

Foszforilált MYPT1 N- és C-terminális deléciós mutánsok hatása a PP1c aktivitásra

ILK-zal tiofoszforilált MYPT1 rövidített mutánsokat használva tanulmányoztuk N- és C-terminálison bekövetkező foszforiláció hatását a PP1c aktivitásra.

A foszforilált His-MYPT1¹⁻⁵¹¹, a defoszforilált formához hasonló (Hirano és mtsai, 1997) aktiváló hatást fejtett ki. A ILK-zal és ZIP-kinázzal foszforilált His-MYPT1-C gátolta a PP1c aktivitást. A PKA-val tiofoszforilált His-MYPT1-C a teljes hosszúságú MYPT1 foszforilációhoz hasonlóan nem befolyásolta a PP1c aktivitását (17. ábra) és a defoszforilált His-MYPT1-C-hez hasonló hatást mutatott.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a MYPT1 N-terminális régióban található foszforilációs hely (Thr495) foszforilációja nem befolyásolja fragmentum PP1c-vel való kölcsönhatását. Továbbá felhívják a figyelmet arra is, hogy a MYPT1 C-terminális fragmentjének gátló helyen foszforilált formái csak a foszforilált MYPT1-nél nagyobb koncentrációban képesek PP1c-et gátolni. Ez arra utal, hogy a gátlás kifejlődésében jelentős szerepe lehet a PP1c és a MYPT1 N-terminális peptidszakasz között kialakuló kölcsönhatásnak is.



17. ábra Foszforilált MYPT1 mutánsok hatása a PP1c foszfatáz aktivitására

○ Defoszforilált-His-MYPT1-C; □, ILK-zal tiofoszforilált His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ (0,8 mol P/mol), △, ILK-zal tiofoszforilált His-MYPT1-C (0,75 mol P/mol); ▼, ZIP-kinázzal tiofoszforilált His-MYPT1-C (1,4 mol P/mol); ●, PKA-val tiofoszforilált His-MYPT1-C (1,9 mol P/mol) hatását vizsgáltuk a PP1c (5 nM) foszfatáz aktivitására [³²P]MLC20 szubsztráttal.

MEGBESZÉLÉS

A miozin foszforilációja és defoszforilációja fontos szabályozó szerepet játszik a simaizom összehúzódásban és a nem-izom sejtekben végbemenő citoskeletális változásokban. A $[Ca^{2+}]_i$ növekedés hatására indukált izomösszehúzódás, és citoskeletális változások mellett olyan jelátviteli utak is lehetségesek, amelyek ezen folyamatok lejátszódásához Ca^{2+} -ionok jelenlétét nem igénylik (Ca^{2+} -szenzitizáció). Az egyik széleskörűen tanulmányozott Ca^{2+} -szenzitizációs folyamat során a RhoA/Rho-kináz aktiválódik, amelynek eredményeként növekszik a miozin foszforiláció a miozin foszfatáz egyidejű, átmeneti gátlásával (Somlyó, 2000). A Ca^{2+} -tól független kontrakció kialakulásában a ZIP-kináz (Niiro és Ikebe, 2001) és az ILK (Deng és mtsai, 2001) szerepét is kimutatták. Nem ismertük azonban ezen kinázok szerepét a miozin foszfatáz szabályozásában. A trombociták aktiválását és alakváltozását szintén a miozin foszforiláció szabályozza a simaizmokhoz hasonlóan Ca^{2+} -tól függő és Ca^{2+} -tól független jelátviteli útvonalakon keresztül (Sellers és mtsai, 1991; Amano és mtsai, 1996). Munkacsoportunk korábbi adatai szerint a trombocita citoskeleton tartalmaz olyan kinázokat, amelyek

EGTA jelenlétében (Ca^{2+} -távollétében) képesek a MYPT1-et foszforilálni (Murányi és mtsai, 1998). Munkánk elsődleges célkitűzése azoknak a trombocita és simaizom kinázoknak az azonosítása volt, amelyek a miozin foszfataz gátlásával képesek elősegíteni a Ca^{2+} -érzékenyítési folyamatokat.

Kimutattuk, hogy a trombocita citoszkeleton fő protein foszfataz komponense a miozin foszfataz, mivel a citoszkeleton csak PP1c katalitikus alegységet tartalmaz, továbbá a PP1c δ -val végzett felülrétegzési kísérletekkel csak egy PP1c-kötő fehérjét, a 130/133 kDa MYPT1-et sikerült azonosítanunk. Eredményeink szerint a trombocita citoszkeletonban az endogén kináz(ok) által katalizált foszforilációs folyamatok a foszfataz aktivitás gátlását eredményezik foszforiláz α és miozin könnyűlánc szubsztráttal is. Ez a gátlási mechanizmus hasonló a Rho-kináz hatásához, amely a miozin foszfataz foszforiláz- és miozin foszfataz aktivitását a MYPT1 Thr695 oldallánc foszforilációján keresztül gátolja (Feng és mtsai, 1999). Kimutattuk, hogy a citoskeletális kinázok a MYPT1 Thr695 oldalláncát foszforilálják, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy a foszforilációt katalizáló enzim a Rho-kináz. Eredményeink szerint azonban a Rho-kináz a trombociták citoskeletális frakciójában nincs jelen, az enzim a membrán és citoszolikus frakciókban lokalizálható. Ezzel összhangban a citoszkeletonban foszforiláció hatására bekövetkező foszfataz aktivitás csökkenést és az ezzel párhuzamosan bekövetkező MYPT1 foszforilációt a Thr695 oldalláncon specifikus Rho-kináz inhibitorok nem befolyásolják. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a MYPT1-et foszforiláló citoskeletális kinázok a Rho-kináztól eltérő enzim(ek) lehetnek.

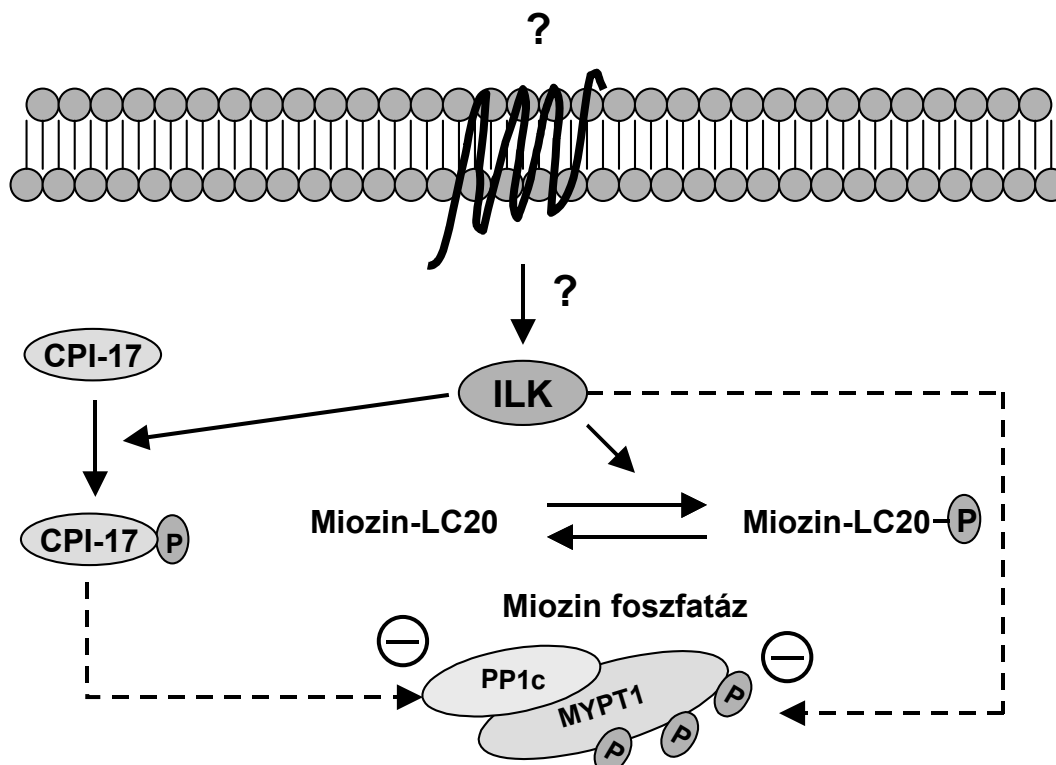
A trombocita citoszkeletonban 54-59 kDa MYPT1-kináz(ok) jelenlétét mutattuk ki. A kináz(ok) molekulatömege hasonló a ZIP-kináz (52-54 kDa) és az ILK (59 kDa) molekulatömegéhez. Western-blottal mindkét kináz jelenlétét kimutattuk a trombocita citoskeletális frakciókban. A ZIP-kinázt szerepét főleg a Ca^{2+} -tól független simaizom összehúzódásban feltételezik, mivel a MLC20-ot foszforilálja (Niiri és Ikebe, 2001). MacDonald és mtsai (2001a) azonosítottak egy ZIP-kinázzal homológ, de kisebb méretű 32 kDa fehérjét, amely képes a MYPT1-et foszforilálni a gátló helyen. Eredményeink szerint azonban a 32 kDa ZIP-kinázhoz hasonló méretű enzim trombocitában a citoszkeletonban nem, csak a membrán frakcióban fordul elő. Az ILK szerepét eddig szintén csak a Ca^{2+} -tól független izomösszehúzódás során lejátszódó MLC20 foszforilációban írták le (Deng és mtsai, 2001). Ezen előzetes eredmények, valamint a trombocitákkal végzett előkísérletek alapján indokoltnak tűnt a trombocita citoskeletális ZIP-kináz és ILK szubsztrát-specifitásának vizsgálata. A kromatográfiás technikával

elválasztott és részlegesen tisztított trombocita citoskeletális kinázokkal végzett kinetikai mérések alapján ZIP-kináz a simaizom enzimhez hasonlóan elsősorban a MLC20-ot foszforilálja, aktivitása a MYPT1 szubsztráttal meglehetősen alacsony. Ezzel szemben az ILK a MYPT1-et és a MLC20-ot is foszforilálja. A fenti eredmények szerint az ILK-nak a Rho-kinázhoz hasonló szabályozó szerepe lehet a trombocita alakváltozás szabályozásában. A MLC20 és MYPT1 párhuzamos foszforilációjával növeli a miozin foszforiláció mértékét, és ezzel elősegíti a trombocita alakváltozást. A ZIP-kináz valószínűleg csak a MLC20 foszforilációját katalizálja és ezzel segíti elő a trombocita aktivációt. Az ILK a miozin foszfátáz MYPT1 alegységét három oldalláncon foszforilálja (Thr495, Thr695, Thr709). A Thr695 oldallánc foszforilációja okozza a foszfátáz aktivitás gátlását, a másik két oldallánc foszforilációjának szerepét még nem ismerjük.

Eredményeink alapján felmerül a kérdés, hogyan illeszthető be az ILK és ZIP-kináz miozin foszforilációt és miozin foszfátáz aktivitást szabályozó szerepe a citoskeletális átrendeződéseket, ill. a simaizom összehúzódást szabályozó jelátviteli folyamatokba. Simaizom preparátumokon és trombocitákon végzett kísérletek szerint sejtpermeábilis toxinok alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett is simaizom összehúzódást (Weber és mtsai, 1999), ill., trombocita alakváltozást (Kurisaki és mtsai, 1995; Murányi és mtsai, 1998) indukálnak és ezzel párhuzamosan növekszik a miozin foszforilációjának mértéke is. Ez receptor stimulációtól független kináz aktivitásra utal, amelyet foszfátáz inhibitorok távollétében a foszfátáz(ok) aktivitása ellensúlyoz. Ezért nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ és RhoA aktiválás mellett, amikor az MLCK és a Rho-kináz aktivitása is alacsony, a ZIP-kináznak és az ILK-nak lehet szerepe a miozin és a MYPT1 foszforilációjában. Az ILK és a ZIP-kináz szubsztrátjai (miozin, MYPT1, CPI-17) megegyeznek a Rho-kinázéval. Az irodalmi adatok, valamint saját eredményeink fényében felmerülhet a kérdés, vajon miért van szükség a miozin foszforilációs szintjének ilyen sokoldalú szabályozására. Az egyik lehetséges válasz, hogy a szabályozó fehérjék lokalizációja részben eltérő. Eredményeink szerint pl. az ILK jelen van a citoskeletonban, ahol a Rho-kináz nem mutatható ki. Hasonlóan, a 32-35 kDa ZIP-kináz kizárólagos lokalizációját tapasztaltuk a trombocita membrán frakcióban, ahol viszont az 52-54 kDa ZIP-kináz, az ILK és a Rho-kináz is jelen van.

Az ILK és a ZIP-kináz jelátviteli folyamatokban történő aktiválódásának mechanizmusát még nem ismerjük. Kimutatták, hogy az ILK kötődik az integrinek β alegységéhez, valamint aktint kötő fehérjékhez, azonban ezen kölcsönhatásoknak az ILK aktivitás szabályozásában játszott szerepe még nem tisztázott. Eredményeink elsősorban *in*

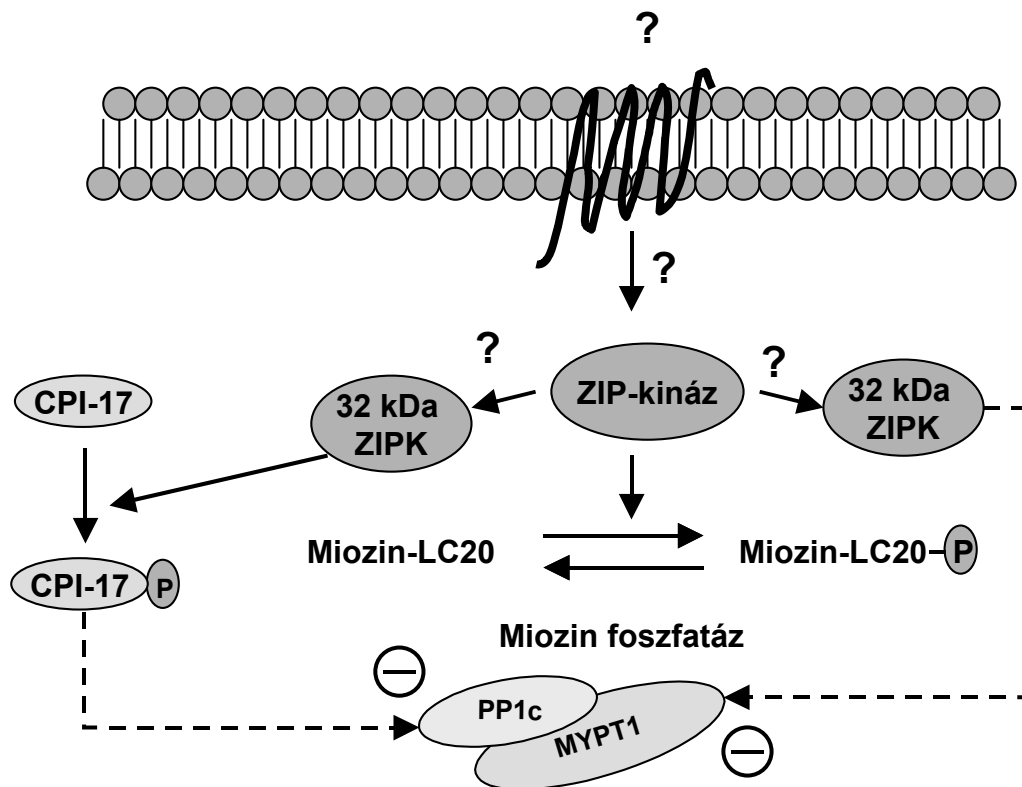
vitro adatokkal szolgálnak annak bizonyítására, hogy az ILK feltételezhetően az alábbi séma szerint vehet részt a miozin foszforilációs szintjének szabályozásában.



Ezen szabályozási folyamatok, a RhoA/Rho-kináz hatásához hasonlóan, a kontraktilis folyamatok kifejlődését segíthetik alacsony intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnál a miozin és a MYPT1 foszforilációjával. Az ILK a Rho-kinázhoz hasonló hatású abban is, hogy CPI-17 fehérje foszforilációjával is fokozhatja annak miozin foszfatáz holoenzimet gátló képességét (Deng és mtsai, 2002). Ez utóbbi folyamat is része lehet a Ca^{2+} -érzékenyítési mechanizmusnak és fokozhatja a miozin foszforiláció mértékét, mivel szintén a foszfatáz aktivitás gátlását teszi lehetővé.

A ZIP-kinázról feltételezik, hogy az enzim dimerizációja szükséges az aktiválódáshoz. Nem ismeretesek azonban a fiziológiai stimulusok és az enzim aktiválódása közötti részfolyamatok. A miozin foszforilációjában a ZIP-kináz is részt vehet, de eredményeink szerint az enzim nagy molekulatömegű formája (52-54 kDa) csak a miozin foszforilációját katalizálja, a MYPT1-et foszforiláló aktivitása viszonylag alacsony, CPI-17 fehérjét foszforiláló képességét pedig még nem ismerjük. Érdekes azonban, hogy a ZIP-kináz katalitikus régiójához hasonló 32 kDa ZIP-kináz irodalmi adatok szerint a miozin foszforilációját, a MYPT1 gátló foszforilációját, valamint a CPI-17 foszforilációját is képes katalizálni. Eredményeink szerint trombocitákban a kisebb molekulatömegű ZIP-kináz (~35 kDa) a membrán frakcióban van jelen. További

vizsgálatok szükségesek azonban annak bizonyítására, hogy ez az enzim egy kisebb molekulatömegű izoformának felel-e meg, vagy a nagyobb molekulatömegű formából keletkezik, pl. proteolitikus hasítással.



A fenti szabályozási folyamatok fontosságának fényében az ILK és a ZIP-kináz jelátviteli folyamatokkal való kapcsolatának kiderítése feltehetően további intenzív kutatások tárgya lesz a közeljövőben.

ÖSSZEFOGLALÁS

A miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja fontos szerepet játszik a simaizom és nem-izom sejtek kontraktilis folyamatainak szabályozásában. A miozin foszforilációjának mértéke a miozin kináz(ok) és a miozin foszfatáz aktivitásának viszonyát tükrözi, amely a sejtet ért fiziológiai hatásokra az átalakító enzimek aktivitásának szabályozásával változhat. A miozin foszfatázt a protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) és a PP1c-hez és a miozinhoz egyaránt kötődő 130/133 kDa regulátor alegység (MYPT1) alkotja. A miozin foszfatáz aktivitása a MYPT1 Rho-kináz által Thr695 oldalláncon történő foszforilációjával gátolható. Célunk új simaizom és trombocita miozin és MYPT1 kinázok azonosítása, valamint a miozin foszfatáz aktivitás szabályozásának tanulmányozása volt a MYPT1-et foszforiláló új kinázokkal.

Eredményeink szerint a trombocita citoszkeleton Rho-kináztól eltérő protein kinázokat tartalmaz, amelyek a MYPT1-et a Thr695 oldalláncon foszforilálják és ezzel a miozin foszfatáz gátlását okozzák. A trombocita citoszkeleton MYPT1 kináz, gélben végzett kináz reakció alapján, ~54-59 kDa fehérjének felel meg. Trombocita citoszkeleton és membrán frakciókban Westren-blottal 52-54 kDa ZIP-kináz (zipper-interacting kinase) és az 59 kDa ILK (integrin-linked kinase) jelenlétét mutattuk ki. A citoszkeletális ZIP-kináz és ILK enzimeket elválasztottuk, majd részlegesen tisztítottuk. A ZIP-kináz főleg a MLC20-ot foszforilálta, a MYPT1 szubsztrát fehérjéjével alacsony aktivitást mutatott. Az ILK a miozint és a MYPT1-et (a Thr695 oldalláncon) egyaránt foszforilálta. Kimutattuk, hogy az ILK a zúzából tisztított miozin foszfatáz holoenzimmel asszociál és a preparátumban az ILK a MYPT1-et foszforilálja. Tisztított ILK enzimmel MYPT1-et és MYPT1 mutánsokat (N- és C-terminális peptidszakaszokat) foszforiláltunk, amelyekben a Thr495, a Thr695 és a Thr709 foszforilált oldalláncokat azonosítottuk. A foszforilált MYPT1 PP1c aktivitást gátló hatása a Thr695 oldallánc foszforilációjának mértékével volt arányos.

Eredményeink arra utalnak, hogy az ILK a trombocita citoszkeletonban részt vehet a miozin foszfatáz szabályozásában, ami a RhoA/Rho-kináz jelátvitel útvonal mellett meglévő új mechanizmus létezését igazolja. Az ILK a miozin foszfatáz holoenzimmel asszociál és foszforilálja a miozint és a MYPT1-et is, így szerepe lehet a sejtek citoszkeletális változásait kísérő folyamatok szabályozásában.

SUMMARY

Phosphorylation of the 20 kDa light chain (MLC20) of myosin plays an important role in the regulation of the contractility of smooth muscle and non-muscle cells. The phosphorylation level of myosin reflects the balance of the activities of the myosin kinase(s) and the myosin phosphatase. Both enzymes are subject to regulation in response to physiological stimuli. The myosin phosphatase (MP) consists of type 1 protein phosphatase catalytic subunit (PP1) and 130/133kDa myosin phosphatase target subunit (MYPT1). The activity of MP has been shown to be inhibited via the phosphorylation of MYPT1 by Rho-kinase at Thr695. The goal of the present work was to identify novel myosin and MYPT1 kinases in smooth muscle and human platelets and to study the regulation of MP by phosphorylation of MYPT1.

Our data show that platelet cytoskeleton includes kinase(s) that are distinct from Rho-kinase and they are able to phosphorylate MYPT1 at Thr695 causing inhibition of MP. In-gel kinase assay identified an ~54-59 kDa MYPT1 kinase in the cytoskeleton. Western blots detected zipper-interacting protein kinase (ZIP-kinase) and integrin-linked kinase (ILK) at ~54-59 kDa in the cytoskeleton and membrane fractions of platelets. Cytoskeletal ZIP-kinase and ILK were separated and partially purified. ZIP-kinase preferentially phosphorylated MLC20 and had low activity on MYPT1. ILK phosphorylated both MLC20 and MYPT1 and the phosphorylation of MYPT1 occurred at Thr695. ILK was associated with MP holoenzyme purified from gizzard smooth muscle and it phosphorylated MYPT1 in this preparation. Using purified ILK, MYPT1 and its N- and C-terminal fragments were phosphorylated and the phosphorylation sites were determined. ILK phosphorylated Thr495, Thr695 and Thr709 in MYPT1. The inhibitory potency of the phosphorylated MYPT1 on the activity of PP1c was proportional with the extent of phosphorylation at Thr695.

The above results raise the potential for regulation of MP activity in platelet cytoskeleton by ILK and suggest an alternative to the Rho-linked pathway. The findings that ILK phosphorylated both myosin and MYPT1, and the association of ILK with MP suggest that ILK may influence cytoskeletal structure or function.

IRODALOMJEGYZÉK

- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura T and Kaibiuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) *J. Biol. Chem.* **271**, 20246-9
- Andreassen P R, Lacroix F B, Villa-Moruzzi E and Margolis R L (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha gamma1 and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **141**, 1207-1215
- Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P. (1992) The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* **210**, 1023-35
- Alessi DR, Street AJ, Cohen P, Cohen PT (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem.* **213**, 1055-66.
- Axton JM, Dombradi V, Cohen PT, Glover DM. (1990) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell.* **63**, 33-46.
- Bauer M, Retzer M, Wilde JJ, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP and Siess W (1999) Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* **94**, 1665-1672.
- Beullens M, Van Eynde A, Vulsteke V, Connor J, Shenolikar S, Stalmans W and Bollen M (1999) Molecular determinants of nuclear protein phosphatase 1 regulation by Nipp-1 *J. Biol. Chem.* **274**, 14053-14061
- Blockmans D, Deckmyn H and Vermeylen J (1995) Platelet activation. *Blood Rev.* **9**, 143-156.
- Bollen M (2001) Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci.* **26**, 426-31.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Broustas CG, Grammatikakis N, Eto M, Dent P, Brautigan DL, Kasid U. (2002) Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* **277**, 3053-9
- Chen YM, Chen MX, Alessi D R, Campbell DC, Shanahan C, Cohen P and Cohen PTW (1994) Molecular Cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1 M. *FEBS Lett.* **356**, 51-5.
- Cohen P, Alemany S, Hemmings BA, Resink TJ, Stralfors P and Tung HY (1988) Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **159**, 390-408.
- Cohen PT. (2002) Protein phosphatase 1 targeted in many directions. *J Cell Sci.* **115**, 241-56.
- da Cruz e Silva EF, Fox CA, Ouimet CC, Gustafson E, Watson SJ, Greengard P. (1995) Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci.* **15**, 3375-89.

- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J.* **351**, 95-105.
- Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C and Walsh MP (2001) Ca^{2+} -independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase. *J.Biol.Chem.* **276**, 16365-16373.
- Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP.(2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase Inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J* **367**, 517-524
- Dombrádi V (1997) Comparative analysis of Ser/Thr protein phosphatases Trends in Comp Biochem. Physiol. **3**, 23-47
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* **16**, 1876-87.
- Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S. (1996) Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. *Biochemistry.* **35**, 5220-8.
- Erdődi F, Csontos C, Sparks L, Murányi A and Gergely P (1992) Purification and characterization of three distinct types of protein phosphatase catalytic subunits in bovine platelets. *Arch.Biochem.Biophys.* **298**, 682-687.
- Erdődi F, Tóth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ and Gergely P (1995) Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *Am.J.Physiol.* **269**, C1176-C1184.
- Eto M, Seba S, Morita F and Yazawa M (1997) Molecular cloning of a novel phosphorylation dependent inhibitory protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth
- Eto M, Karginov A. and Brautigen D.L.(1999) A novel Phosphoprotein inhibitor protein of type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry* **38**, 16952-16957
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ and Nakano T (1999) 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, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, Hartshorne DJ and Nakano T (1999) Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J.Biol.Chem.* **274**, 3744-3752.
- Fox JE (1993) The platelet cytoskeleton. *Thromb.Haemost.* **70**, 884-893.
- Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T and Ito M (1998) A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics* **49**, 59-68.
- Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, Kaibuchi K. (1998) Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *Cell Biol* **141**, 409-18
- Gohla A, Schultz G, Offermanns S. (2000) Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* **87**, 221-7

- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC and Kuriyan J (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**, 745-753
- Gong MC, Fujihara H, Somolyo AV and Somolyo AP (1997) Translocation of *rhoA* associated with Ca^{2+} sensitisation of smooth muscle J. Biol. Chem. **272**, 10704-9.
- Hamaguchi T, Ito M, Feng J, Seko T, Koyama M, Machida H, Takase K, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ and Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **274**, 825-830.
- Hartshorne DJ, Ito M and Erdödi F (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J.Muscle Res.Cell Motil.* **19**, 325-341.
- Hirano K, Ito M and Hartshorne DJ (1995) Interaction of the ribosomal protein, L5, with protein phosphatase type-1 J. Biol. Chem. **270**, 19786-90.
- Hirano K, Phan BC and Hartshorne DJ (1997) Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* **272**, 3683-3688.
- Hubbard, M. J. and Cohen P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation *Trends Biochem. Sci.* **18**, 172-7
- Ichikawa K, Ito M and Hartshorne DJ (1996) Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J.Biol.Chem.* **271**, 4733-4740.
- Ingebristen TS, Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation *Science* **221**, 331-338
- Ito M, Feng J, Tsujino S, Inagaki N, Inagaki M, Tanaka J, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Nakano T. (1997) Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry* **36**, 7607-14
- Johnson D, Cohen P, Chen MX, Chen YH, Cohen PT. (1997) Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem* **244**, 931-9
- Kameshita I and Fujisawa H (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal.Biochem.* **183**, 139-143.
- Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H and Akira S. (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **18**, 1642-1651.
- Khatri JJ, Joyce KM, Brozovich FV and Fischer SA (2001) Role of myosin phosphatase isoforms in cGMP-mediated smooth muscle relaxation J. Biol. Chem. **276**, 37250-37257.
- Kimura K, Fukata Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1998) Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *J Biol Chem* **273**, 5542-8
- Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP and Brautigan DL (2000) Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J.Biol.Chem.* **275**, 9897-9900.

- Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ and Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett.* **475**, 197-200.
- Kurisaki T, Taylor RG and Hartshorne DJ (1995) Effects of the protein phosphatase inhibitors, tautomycin and calyculin-A, on protein phosphorylation and cytoskeleton of human platelets. *Cell Struct.Funct.* **20**, 331-343.
- MacDonald JA, Borman MA, Murányi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ and Haystead TA (2001a) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* **98**, 2419-2424.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigan DL, Haystead TA (2001b) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett* Mar 30;493(2-3):91-4
- MacKintosh C, MacKintosh RW (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases *Trends. Biochem Sci.* **19**, 444-448
- MacKintosh C, Garton AJ, McDonnell A, Barford D, Cohen PT, Tonks NK, Cohen P Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett.* 1996 **397**, 235-8.
- Murányi A, Erdődi F, Ito M, Gergely P and Hartshorne DJ (1998) Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem.J.* **330**, 225-231.
- Murányi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF and Hartshorne DJ (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett.* **493**, 80-84.
- Murata-Hori M, Suizu F, Iwasaki T, Kikuchi A and Hosoya H (1999) ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells. *FEBS Lett.* **451**, 81-84.
- Nakai K, Suzuki Y, Kihira H, Wada H, Fujioka M, Ito M, Nakano T, Kaibuchi K, Shiku H and Nishikawa M (1997) Regulation of myosin phosphatase through phosphorylation of the myosin-binding subunit in platelet activation. *Blood* **90**, 3936-3942.
- Nakamura M, Ichikawa K, Ito M, Yamamori B, Okinaka T, Isaka N, Yoshida Y, Fujita S, Nakano T. (1999) Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* **11**, 671-6.
- Niirō N and Ikebe M (2001) Zipper-interacting Protein Kinase Induces Ca²⁺-free Smooth Muscle Contraction via Myosin Light Chain Phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **276**, 29567-29574.
- Paul BZ, Daniel JL and Kunapuli SP (1999) Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J.Biol.Chem.* **274**, 28293-28300.
- Raghavan S, Williams I, Aslam H, Thomas D, Szoor B, Morgan G, Gross S, Turner J, Fernandes J, VijayRaghavan K, Alpey L. (2000) Protein phosphatase 1beta is required for the maintenance of muscle attachments. *Curr Biol.* **10**, 269-72.
- Senba S, Eto M and Yazawa M (1999) Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle. *J.Biochem.(Tokyo)* **125**, 354-362.

- Sellers JR (1991) Regulation of cytoplasmatic and smooth muscle myosin Curr. Opin. Cell. Biol. **3**, 98-104
- Shima H, Hatano Y, Chun YS, Sugimura T, Zhang Z, Lee EY, Nagao M. (1993) Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. **192**, 1289-96.
- Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ and Nakano T (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. J.Biol.Chem. **269**, 30407-30411.
- Shin HM, Je HD, Gallant C, Tao TC, Hartshorne DJ, Ito M, Morgan KG. (2002) Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. Circ Res.**90**, 500-2.
- Skinner JA, Saltiel AR (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. Biochem J **356**, 257-6
- Somlyo AP and Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle Nature **372**, 231-236
- Somlyo AP and Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. J.Physiol. **522**, 177-185.
- Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, Narumiya S, Shiku H and Nishikawa M (1999) Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. Blood **93**, 3408-3417.
- Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ and Walsh MP (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺-sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. J.Physiol. **522**, 33-49.
- Takizawa N, Niino N, Ikebe M. (2002) Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. FEBS Lett **515**, 127-32.
- Tan I, Ng CH, 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.
- Tóth A, Kiss E, Gergely P, Walsh MP, Hartshorne DJ and Erdődi F (2000) 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.
- Tóth A, Kiss E, Herberg FW, Gergely P, Hartshorne DJ and Erdődi F (2000) 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 DJ, 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.
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hosoya H, Hartshorne DJ and Matsumura F (1999) Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. J.Cell Biol. **144**, 735-744.

- Toyoda H, Nakai K, Omay SB, Shima H, Nagao M, Shiku H and Nishikawa M (1996) Differential association of protein Ser/Thr phosphatase types 1 and 2A with the cytoskeleton upon platelet activation. *Thromb.Haemost.* **76**, 1053-1062.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. **389** 909-9, 911
- Watanabe Y, Ito M, Kataoka Y, Wada H, Koyama M, Feng J, Shiku H and Nishikawa M (2001) Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase is involved in human platelet secretion. *Blood* **97**, 3798-3805.
- Weber LP, Van Lierop JE, Walsh MP (1999) Ca²⁺-independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments. *J Physiol* **516**, 805-24
- Wu J, Liu J, Thompson I, Oliver CJ, Shenolikar S, Brautigan DL. (1998) A conserved domain for glycogen binding in protein phosphatase-1 targeting subunits. *FEBS Lett.* **439**, 185-91.
- Wu C, Dedhar S. (2001) Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol* **155**, 505-10
- Zhang Z, Bai G, Shima M, Zhao S, Nagao M and Lee EYC (1993) Expression and characterisation of rat protein phosphatases -1 α , -1 γ 1, -1 γ 2, -1 δ *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 402-406

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdődi Ferencnek, témavezetőmnek hozzáértő szakmai irányításáért, amelynek segítségével mind gyakorlati mind elméleti ismereteimet bővíthettem az TDK illetve Ph.D. hallgatóként eltöltött évek alatt. Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanár úrnak, hogy munkámat támogatta és hogy lehetővé tette a kísérleteim elvégzését a Debreceni Egyetem OEC Orvosi Vegytani Intézetben.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor szívesen fordulhattam hozzájuk segítségért. Külön szeretném megköszönni Dr. Csontos Csilla és Lontay Beáta barátságát és a tőlük munkám során kapott tanácsokat. Köszönöm Tóth Attilának, hogy segítségével elsajátíthattam a biokémiai módszerek alapjait. Dr. Németh Árpádnénak pedig a mindennapos kísérletes munkám megkönnyítésért vagyok hálás.

Köszönettel tartozom Dr. David J. Hartshorne professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy laboratóriumában, az Arizonai Egyetemen elvégezzük a miozin foszfatáz holoenzim vizsgálatával kapcsolatos kísérleteket. Itt szeretném megköszönni Dr. Murányi Andrea segítségét ezen kísérletek elvégzésében.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm szüleim és testvérem szeretetét, türelmét, amely mindig igazi családi háttérrel biztosított a munkám során.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kiss, E., Murányi, A., Csontos, Cs., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D.J., Erdődi, F.: *Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton* Biochem J. **365**, 79-87 (2002)
IF: 4,326

Murányi, A., MacDonald, J.A., Deng, T.J., Wilson, D. P., Haystead, T. A., Walsh, M. P., Erdődi, F., **Kiss, E.**, Wu, Y., Hartshorne, D.J.: *Phosphorylation of myosin target subunit by integrin- linked kinase* Biochem. J. 2002 **366**, 211-6 (2002)
IF: 4,326

Könyvrészlet:

Kiss, E., Tóth, A., Erdődi, F.: *The role of subunit interactions and phosphorylation in the regulation of myosin phosphatase* Protein Modules in Cellular Signaling, Life Sciences **318** 232-240 (2001)

Egyéb közlemények:

Tóth, A., **Kiss, E.**, Herberg, F.W., Gergely, P., Hartshorne D. J., Erdődi, F.: *Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance* Eur. J. Biochem **267**, 1687-1697 (2000)
IF: 2,849

Tóth, A., **Kiss, E.**, Gergely, P., Walsh, M.P., Hartshorne D. J. and Erdődi, F.: *Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PPI catalytic subunit and the 20 kDa myosin light chain* FEBS Letters **484**, 113-117 (2000)
IF: 3,644

Előadások és posztterek az értekezés témájában:

Előadások:

Kiss, E.: *A Miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása foszforilációval trombocita citoskeletonban*, Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Ph.D. konferencia, **2000**

Kiss, E.: Gergely, P., Erdődi, F.: *A miozin foszfatáz szabályozása citoskeletonban* Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Konferencia, Eger **2001**. Október 11.-13.

Posztterek:

Kiss, E., Bai, P., Csontos, Cs., Gergely, P., Erdődi, F.: *A miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása citoskeletonban* Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya, 5. Munkaértekezlete Sopron, **2000**

- Erdődi, F., **Kiss, E.**, Tóth, A., Csontos, Cs., Murányi, A., Gergely, P., Ito, M. és Hartshorne, D. J. *Phosphorylation of the N-terminal region and the inhibitory site in myosin phosphatase target subunit by protein kinases in platelet cytoskeleton* FASEB Summer Research Conferances, **2000**
- Kiss, E.**, Csontos, Cs., Bai, P., Gergely, P., Ito, M. és Hartshorne, D. J. and Erdődi, F.: *Phosphorylation and regulation of the myosin phosphatase by protein kinases in platelet cytoskeleton* NATO/FEBS Advanced Study Institute St-Martin-de-Londres, Franciaország **2000**.
- Kiss, E.**, Murányi, A., Csontos, Cs., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J és Erdődi, F.: *Targeting and phosphorylation of myosin phosphatase in human platelet cytoskeleton* Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases EMBO Conference Marburg, Germany, **2001**
- Kiss, E.**, Csontos, Cs., Bai, P., Gergely, P., Erdődi, F.: *A miozin foszfatázt foszforiláló protein kinázok azonosítása trombocita citoskeletonban*. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (Debrecen) **2001**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai