

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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

BEVEZETÉS

A fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) és tirozin (Tyr) oldalláncainak foszforilációjával-defoszforilációjával történő kovalens módosítása a sejt folyamatok szabályozásának fontos mechanizmusa. A sejtfehérjék foszforilációs szintjét mind nyugalmi állapotban mind a sejtet ért hatásokra (receptor aktiválás, membránpotenciál változás, növekedési faktorok stb.) a foszforilációt katalizáló protein kinázok és a defoszforilációt katalizáló protein foszfatázok aktivitásának viszonya 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 kialakításában. A fehérjék foszforilációja túlnyomórészt Ser és Thr oldalláncokon játszódik le ($> 90\%$), ezért ezt a módosítást ismerték fel először, így a Ser/Thr specifikus protein kinázok és foszfatázok szabályozási lehetőségeinek vizsgálata került kezdetben előtérbe. A fehérjék foszforilációjában a protein kinázok és foszfatázok egyenrangú partnerek és mindkét enzim szabályozása hozzájárul a megfelelő foszforilációs szint kialakulásához.

A protein kináz és foszfatáz szabályozási lehetőségek vizsgálatának egyik kedvelt modellrendszere a simaizom összehúzódás, ill. a sejtek kontraktilis sajátságainak tanulmányozása. Ezen fiziológiai és farmakológiai szempontból is fontos folyamatok lejátszódásának előfeltétele a miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja. Az MLC20 foszforilációjának fokozódását és ezzel az izom összehúzódását a kontrakciós mechanizmusok klasszikus elmélete szerint a Ca^{2+} -kalmodulin függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) aktiválódása biztosítja. Az utóbbi években azonban kimutatták, hogy az izom összehúzódása (vagy pl. a sejtek alakváltozása), valamint a miozin foszforilációja viszonylag alacsony intracelluláris Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ koncentrációknál is megvalósul, amelyben fontos szerepet játszanak a miozint foszforiláló nem Ca^{2+} -függő kinázok, valamint a miozin foszfatáz átmeneti gátlása is. Ezek a felismerések a miozint, valamint a miozin foszfatázt foszforiláló kinázok azonosításának fontosságára irányították a figyelmet.

A miozin foszforiláció szabályozása simaizom összehúzódás során

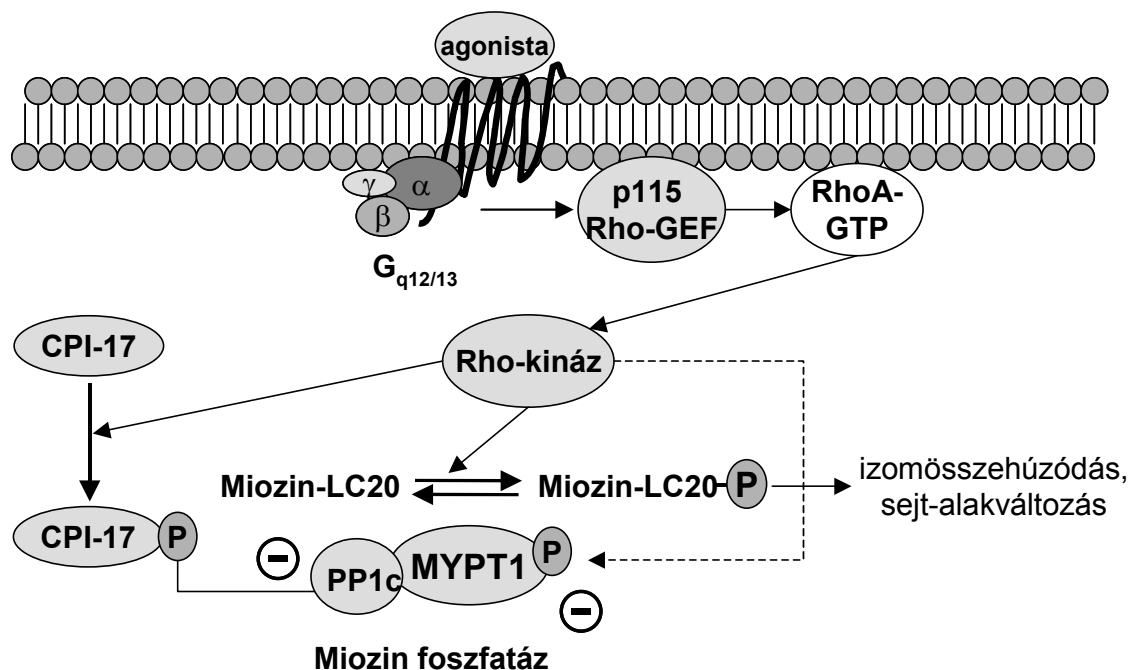
A simaizom összehúzódása az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedését kiváltó membrán depolarizáció vagy agonisták (angiotenzin, α_1 -adrenerg agonisták) receptorokkal való kölcsönhatására következik be. Az extracelluláris térből beáramló és/vagy a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca^{2+} a kalmodulinhoz (CaM) kötődik, a Ca-CaM komplex pedig aktiválja a

miozin könnyűlánc kinázt (MLCK). Az aktivált MLCK a Ser19/Thr18 oldalláncokon foszforilálja a miozin 20 kDa könnyűláncát (MLC20). A miozin foszforilációja növeli az aktomiozin ATPáz aktivitást, ami elősegíti az izom összehúzódását. A foszforilált miozin defoszforilációját a miozin foszfatáz katalizálja elősegítve ezzel az izom elernyedését. A szabályozást illetően először a Ca^{2+} -függő foszforilációs folyamatoknak tulajdonítottak nagyobb jelentőséget, a miozin foszfatáz szerepéről azt feltételezték, hogy mindössze a folyamat megfordíthatóságát biztosítja. A miozin foszforilációs szintjének kialakulásában a miozin foszfatáz/kináz aktivitás arány megváltozásának is szerepe van, elsősorban alacsony Ca^{2+} -koncentrációknál. Ezért fontos a miozin foszfatáz szerepének és szabályozási lehetőségének megismerése.

A miozin foszfatáz három alegységből álló formáját először simaizomból (zúza) izolálták. A holoenzimben a 38 kDa protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegységhez (PP1c) a 130/133 kDa MYPT1 (myosin phosphatase targeting subunit 1) és a 20/21 kDa M20/21 alegységek kapcsolódnak. A miozin foszfatáz aktivitás gátlása membránpermeábilis toxinokkal alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett is képes kontraktilis változásokat előidézni. A foszfatáz aktivitás gátlás hatására ugyanis a protein kinázok és foszfatázok aktivitásának aránya a kinázok javára tolódik el és ez jelentős mértékű miozin foszforilációt eredményez akkor is, ha az MLCK inaktív. Alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett bekövetkező folyamatokban olyan protein kinázok részvételét feltételezik, amelyek a Ca^{2+} -koncentrációtól függetlenül képesek a miozint foszforilálni és ezzel izomösszehúzódást kiváltani. A miozin foszforilációja mellett a miozin foszforilációs szintjének növekedését a miozin foszfatáz gátlása is elősegíti. A miozin foszfatáz gátlás megvalósulhat a MYPT1 gátló foszforilációjával (a Thr 695 oldallánc foszforilációja) vagy a CPI-17 fehérje (17 kDa C-kinase potentiated inhibitor) foszforilációjával is.

A Ca^{2+} -érzékenyítő agonisták hatására kialakuló simaizom összehúzódás során, pl. transzmembrán receptorok aktivációján keresztül a $\text{G}_{q12/13}$ heterotrimer G-fehérje disszociál. A szabadabbá váló $\text{G}_{q12/13\alpha}$ alegység aktiválja a p115Rho-GEF nukleotid kicserélő faktort, ami elősegíti az aktív konformációjú RhoA-GTP komplex kialakulását. A RhoA-GTP képes a Rho-kinázhoz kötődni és ezzel növeli az enzim aktivitását. A Rho-kináz egyrészt foszforilálja a miozint, másrészt foszforilálja a miozin foszfatáz MYPT1 alegységét, amely a foszfatáz aktivitás gátlását eredményezi. A Rho-kináz foszforilációval fokozza a CPI-17 fehérje miozin foszfatázt gátló képességét is, így mindhárom Rho-kináz függő foszforiláció hozzájárulhat a

miozin foszforilációs szintjének növekedéséhez.



Olyan protein kinázokat is azonosítottak, amelyek aktivitásának szabályozása a simaizom összehúzódás során még nem tisztázott, azonban a Ca^{2+} -érzékenyítési folyamatokban feltételezhetően szerepük lehet, mivel képesek a miozint foszforilálni. A ZIP-kináz (Zipper-Interacting Kinase), amelyet mint az apoptotikus folyamatokat kísérő alakváltozásokban szerepet játszó magfehérjét azonosítottak, a MLC20-ot a Ser19/Thr18 oldalláncokon képes foszforilálni és alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett elősegíti az izom összehúzódását. A sejtek és az extracelluláris mátrix kölcsönhatását szabályozó integrinekhez kapcsolódó ILK (Integrin-Linked-Kinase) szintén foszforilálja a MLC20-ot és alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál indukál simaizom összehúzódást.

CÉLKITŰZÉS

Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -tól független protein kinázok egyaránt szerepet játszanak a miozin foszforilációjában. 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 gátolja a miozin foszfatázt a regulátor alegység (MYPT1) és/vagy a foszfatázt gátló CPI-17 fehérje foszforilációjával. A PP1 és PP2A enzimeket gátló membránpermeábilis

toxinok (pl. kalikulin-A, okadainsav stb.) agonisták távollétében, alacsony $[Ca^{2+}]_i$ -nál is képesek simaizom összehúzódást és pl. trombocita alakváltozást előidézni a miozin foszforilációt kiváltani. Ilyen körülmények mellett sem az MLCK, sem a RhoA/Rho-kináz nem aktiválódik. Feltételezhető, hogy a Rho-kinázon kívül más protein kinázok is szerepet játszhatnak az MLC20 foszforilációjában. Ilyen kinázként azonosították az ILK-t és a ZIP-kinázt. Az azonban nem ismert, hogy ezeknek a kinázoknak milyen szerepe lehet a miozin foszfátáz MYPT1 alegységének gátló foszforilációjában.

Munkacsoportunk korábbi eredményei Ca^{2+} -független MYPT1 kináz(ok) és miozin kináz(ok) jelenlétére utaltak humán trombociták citoszkeleton, ill. membrán frakcióiban. Simaizmokban szintén valószínűsíthető volt új MYPT1 kinázok jelenléte és azok stabil asszociációja a több kromatográfiás lépésben tisztított miozin foszfátáz holoenzimmel. Ezeket a trombocita és simaizom MYPT1 kinázokat azonban még nem azonosították. Nem ismertük továbbá a MYPT1 foszforiláció hatását a miozin foszfátáz aktivitására, valamint a MYPT1-ben ezen kinázok által foszforilált foszforilációs helyeket sem. Ezért kutatási célkitűzéseink az alábbi kérdések vizsgálatára irányultak.

1. A trombocita citoszkeletonban lejátszódó foszforilációs folyamatok hatásának tanulmányozása a miozin foszfátáz aktivitására.
2. Trombocita szubcelluláris frakciókban előforduló MYPT1 és miozin kinázok azonosítása.
3. ILK és ZIPK enzimek elválasztása és részleges tisztítása trombocitákból, az izolált enzimek szubsztrátspecifitásának tanulmányozása miozin és MYPT1 szubsztrátokkal.
4. A miozin foszfátáz holoenzimmel asszociálódó MYPT1 kinázok azonosítása, valamint MYPT1-et foszforiláló hatásuk és a foszforilációs helyek feltárása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fehérje tisztítási eljárások

A teljes hosszúságú csirke zúza 133 kDa MYPT1 izoforma szekvenciájának megfelelő GST-MYPT1, a Thr695Ala pontmutációt tartalmazó GST-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 fehérjeként. Az expressziós rendszereket Dr. Masaaki Ito (Mie University Japan) bocsátotta rendelkezésünkre. A GST-MYPT1 és GST-MYPT1^{T695A} fehérjék

tisztítására kétlépéses ioncserés (SP-Sepharose, MonoQ) kromatográfiát alkalmaztunk. A GST-MYPT1-C fehérjét a baktérium lizátum oldható frakciójából glutation-Sepharose 4B affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

A rekombináns His-PP1c δ és a MYPT1 rövidített mutáns fehérjéket N-terminális véghez kapcsolódó hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His) kapcsolva (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1¹⁻⁵¹¹, His-MYPT1-C (514-963 aminosavak)) *Escherichia coli* M15 sejtekben pQE32 expressziós vektort használva állítottuk elő. A fehérjéket az inklúziós testek 6 M Guanidin-HCl-dal történő feltárását követően Ni-agaróz affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A His-PP1c δ aktivitását a denaturáló körülmények jelentősen csökkentették, ezért aktív enzim előállításához a fehérjét a kromatográfiát megelőzően Mn²⁺-ionok jelenlétében renaturáltuk.

A trombociták izolálása, a trombocita lizátum frakcionálása

A mosott trombocita szuszpenziót egészséges donoroktól frissen levett vénás vérből vagy 4-5 napos kórházi trombocita sűrítmenyből állítottunk elő. A mosott trombocitákat 5-10 x 10⁹ trombocita/ml koncentrációban 1 % Triton X-100 jelenlétében lizáltuk. A citoszkeletális frakció elválasztásához a trombocita lizátumot centrifugáltuk (10 000 g). A felülúszóból további centrifugálással (100 000 g) kapott pellet a membrán frakciónak, a kapott felülúszó a citoszol frakciónak felelt meg.

A foszforiláció hatása a trombocita citoszkeleton foszfatáz aktivitására

A trombocita citoszkeleton fehérjéket szuszpendáltuk és 5 mM Mg²⁺, 0,5 mM ATP vagy 0,1-0,5 mM ATP γ S jelenlétében 30 °C-on inkubáltuk. A Rho-kináz inhibitorok hatásának vizsgálata esetén a reakcióközeg 10 μ M Y-27632-t vagy 10 μ M HA1077-t is tartalmazott. Különböző időpontokban a reakcióelegyből mintát vettünk, majd a kináz reakció leállítását követően [³²P]-foszforiláz *a* vagy [³²P]-MLC20 szubsztráttal meghatároztuk a foszfatáz aktivitást. A defoszforilációt 10 percig 30 °C-on végeztük, a reakciót TCA hozzáadásával állítottuk le. A kihasított ³²P_i-ot a kicsapódott fehérjék centrifugálással történő elválasztása után a felülúszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A foszfatáz aktivitást a kontroll mintákhoz hasonlítva (azt 100 %-nak véve) százalékosan adtuk meg.

A MYPT1 és MYPT1 mutánsok foszforilációja

A rövidített mutáns MYPT1 fehérjék foszforilációját trombocita citoszkeletális vagy különböző tisztított kinázokkal 5 mM Mg^{2+} és 0,1-0,5 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel végeztük 30°C-on. A kivett mintákat (5-20 μl) P81 foszfocellulóz papírra cseppentettük, majd a papírokat 0,5 % foszforsavval mostuk. A szubsztrátfehérjékbe épült ^{32}P mennyiségét a papírok acetonnal történő szárítása után szcintillációs számlálóban határoztuk meg.

A foszforiláció auotoradiográfiával történő kimutatásához a reakciót tízszeres térfogatú hideg aceton hozzáadásával állítottuk le. Az elegyet tíz percig 4 °C-on tartottuk, majd a kicsapódott fehérjéket centrifugálással választottuk el (10 000 g 10 perc). A csapadékot SDS minta pufferben oldottuk, és a fehérjéket SDS-PAGE segítségével elválasztottuk. A GST-MYPT1 fehérjébe ill. mutánsokba épült ^{32}P -ot a gélek szárítását követően auotoradiográfiával detektáltuk

A foszforilált MYPT1 mutánsok hatása a PP1c aktivitásra

Tisztított MYPT1 fehérjéket ILK-val, Rho-kinázzal vagy PKA-val foszforiláltuk 5 mM Mg^{2+} , és 0,1 mM ATP γS jelenlétében, 30 °C-on. A foszforilált fehérjék hatását a PP1c (1-5 nM) aktivitásra $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-MLC20}$ szubsztráttal határoztuk meg.

Kináz aktivitás kimutatása SDS PAGE-t követően

A trombocita citoszkeleton és részlegesen tisztított miozin foszfataz preparátumok fehérjéinek elválasztását olyan gélben (10 % akrilamid) végeztük, amelyet szubsztrát fehérjék (100 $\mu\text{g/ml}$ GST-MYPT1-C vagy 100 $\mu\text{g/ml}$ His-MYPT1-C) jelenlétében polimerizáltunk. A fehérjéket a gélben renaturáltuk, majd a kináz reakciót a gél 0,3 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t (500-2000 cpm/pmol) és 5 mM $MgCl_2$ -ot tartalmazó pufferben történő inkubálásával végeztük. A nem specifikusan kötődő radioaktív ATP-t mosással távolítottuk el. A gél 3MM Whatman papíron szárítottuk, és a kináz aktivitást mutató fehérjéket auotoradiográfiával detektáltuk.

ZIP-kináz és ILK elválasztása és részleges tisztítása trombocita citoszkeletonból

Mosott trombocita lizátumból elválasztott citoszkeleton frakciót 0,85 M KCl jelenlétében szuszpendáltunk, majd a szuszpenziót ultrahangos kezelésnek vetettük alá. A szuszpenzió centrifugálása (60 perc, 15 000 g) után kapott felülúszót PD-10 sómentesítő oszlopra vittünk. A puffercsere után a citoszkeletális fehérjéket SP-Sepharose oszlopon

választottuk el. Az oszlopot 75 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel mostuk, majd az oszlophoz kötődő fehérjét 0,075-0,6 M NaCl gradienssel eluáltuk. Az ILK-t az átfolyó frakcióban, a ZIP-kinázt az SP-Sepharose-hoz kötődő frakcióban azonosítottuk. Az ILK-t tartalmazó SP-Sepharose átfolyó frakciókat összegyűjtöttük és 75 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel ekvilibrált MonoQ oszlopra vittük. Az oszlopot 75 mM NaCl-ot tartalmazó pufferrel mostuk, majd az oszlophoz kötődött fehérjét 0,075-1,0 M NaCl gradienssel eluáltuk. A ZIP-kináz további tisztítását az SP-Sepharose-hoz kötődő frakcióból szintén MonoQ kromatográfiával végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A trombocita citoszkeletonban lejátszódó foszforilációs folyamatok hatása a miozin foszfatáz aktivitására

A trombocita szubcelluláris frakciókkal végzett Western-blottal a MYPT1 jelenlétét a trombocita citoszkeletális és membrán frakciókban mutattuk ki. PP1c felülréteggzéssel a citoszkeletális frakcióban egyetlen kötő-fehérjét, a 130/133 kDa MYPT1-et azonosítottuk. A trombocita citoszkeletális frakció csak PP1c-t tartalmaz, PP2A típusú enzimeket nem. Ezért a felülrétegzési adatok arra utalnak, hogy ebben a frakcióban a PP1 típusú enzimek közül a miozin foszfatáz holoenzim a fő Ser/Thr foszfatáz komponens.

A trombocita citoszkeleton frakcióban MgATP-vel vagy MgATP γ S-sel foszforilációt indukáltunk és tanulmányoztuk a foszfatáz aktivitás változását foszforilált miozin könnyűlánc ([^{32} P]-MLC20) és [^{32} P]-foszforiláz *a* szubsztrátokkal. A foszforiláció a frakció miozin foszfatáz és foszforiláz foszfatáz aktivitásának csökkenését eredményezte, ami olyan foszforilációs folyamatokra utalt, amelyek közvetlen (pl. a MYPT1 foszforilációjával) vagy közvetett úton (pl. a CPI-17 foszforilációjával) a miozin foszfatáz aktivitás gátlását eredményezik. Western-blot alapján a CPI-17 a citoszkeletális frakcióban nincs jelen. Ez arra utal, hogy a foszfatáz aktivitást a MYPT1 foszforilációja szabályozza.

A miozin foszfatázt foszforiláló kinázok közül a Rho-kináz szerepét a MYPT1 foszforilációjában és a foszfatáz aktivitás gátlásában trombocitában is jellemezték. Specifikus Rho-kináz inhibitorok (Y27632 vagy HA1077) azonban nem befolyásolták a MgATP γ S hatására bekövetkező foszfatáz gátlás mértékét trombocita citoszkeletonban. Ezzel összhangban Western-blot alapján azt is kimutattuk, hogy a Rho-kináz a trombocita

citoszkeletonban nincs jelen, a fehérje elsősorban a citoszolikus és a membrán frakciókban lokalizálódik. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a trombocita citoszkeletonban a Rho-kináztól eltérő protein kinázok katalizálják a miozin foszfatáz gátló foszforilációját.

Ismert, hogy a Rho-kináz a MYPT1 Thr695 oldalláncának foszforilációjával gátolja a miozin foszfatáz aktivitást. A foszfatáz gátlás mechanizmusának kiderítésére rekombináns GST-MYPT1-et tisztított Rho-kinázzal vagy trombocita citoszkeletális kinázokkal foszforiláltunk és a foszforilált MYPT1-et a foszforilált Thr695-re specifikus antitesttel vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a trombocita citoszkeletális kinázok, a Rho-kinázhoz hasonlóan, a Thr695 oldallánc foszforilációjával fejtik ki gátló hatásukat. Ezek a kísérletek továbbá azt is megerősítették, hogy a citoszkeletális kinázok Thr695 oldalláncot foszforiláló aktivitása Rho-kináz inhibitorokkal nem gátolható, ami új MYPT1 kinázok jelenlétére utal ebben a frakcióban.

Trombocita szubcelluláris frakciókban előforduló MYPT1 és miozin kinázok azonosítása

A MYPT1 kinázok molekulatömegének azonosítására a trombocita citoszkeletális fehérjéket SDS-PAGE-sel olyan gélben választottuk el, amelyet a MYPT1 C-terminális szakaszát (667-1004) tartalmazó szubsztrát fehérje (GST-MYPT1-C) jelenlétében polimerizáltunk. A fehérjéket a gélben renaturáltuk és a kináz reakciót a gél $Mg[\gamma^{32}]ATP$ jelenlétében történő inkubálásával hajtottuk végre. A GST-MYPT1-C fehérjébe épült ^{32}P -ot autoradiográfiával detektáltuk és ezek alapján a kb. 54-59 kDa molekulatömegű kinázt azonosítottunk. Korábban kimutatták, hogy az 52-54 kDa ZIP-kináz és az 59 kDa ILK foszforilálja a MLC20-ot. ZIP-kináz és ILK specifikus antitestekkel végzett Western-blottal kimutattuk, hogy a ZIP-kináz és az ILK a trombocita citoszkeleton és membrán frakciókban is jelen van. Ezért feltételezzük, hogy ezeknek a kinázoknak szerepük lehet a miozin foszfatáz trombocita citoszkeletonban megfigyelt foszforilációjában és gátlásában. A ZIP-kináznak egy kisebb molekulatömegű (~35 kDa) formáját is azonosítottuk a membrán frakcióban.

ILK és ZIP-kináz enzimek elválasztása és részleges tisztítása trombocitákból: az izolált enzimek szubsztrátspecifitásának tanulmányozása miozin és MYPT1 szubsztrátokkal

A trombocita citoszkeletonnal asszociálódó ILK-t és ZIP-kinázt részlegesen tisztítottuk. Az enzimeket SP-Sepharose kromatográfiával választottuk el, majd további

tisztításukat MonoQ oszlopon végeztük. A részlegesen tisztított ZIP-kináz és ILK enzimek szubsztrátspecifitását MLC20, GST-MYPT1 és GST-MYPT1-C szubsztrátokkal határoztuk meg. A ZIP-kináz a MLC20-ba 1,4 mol/mol foszfát beépülését katalizálta, azonban a GST-MYPT1 és a GST-MYPT1-C szubsztrátokat csak kismértékben (<0,2 mol P/mol) foszforilálta. Az ILK mindhárom szubsztrátot foszforilálta de a MLC20-ot a ZIP-kináznál kisebb sebességgel és kisebb mértékben. Az ILK GST-MYPT1 esetén 1,4 mol/mol, GST-MYPT1-C szubsztráttal 1 mol/mol foszfát beépülését katalizálta. Az ILK-zal végzett GST-MYPT1 foszforilációt követően anti-MYPT1^{pThr695} antitesttel kimutattuk hogy az ILK a MYPT1-et a gátló helyen foszforilálta. Az ILK által GST-MYPT1-be beépített foszfátmennyiségből (1,4 mol/mol) arra következtettünk, hogy a Thr695 (a gátló foszforilációs hely) mellett a fehérjében más oldalláncok is foszforilálódnak. Az enzimkinetikai adatok tehát megerősítik az ILK szerepét a MYPT1 foszforilációjában, míg a ZIP-kináz kísérleteink alapján inkább a miozin foszforilációért lehet felelős.

A miozin foszfátáz holoenzimmel asszociálódó MYPT1 kinázok azonosítása, MYPT1-et foszforiláló hatásuk és a foszforilációs helyek feltárása.

Irodalmi adatokból ismert, hogy a simaizomból több lépésben, számos kromatográfiás eljárással tisztított miozin foszfátáz holoenzim preparátum még tartalmaz olyan kinázokat, amelyek a MYPT1 foszforilációjával módosíthatják a foszfátáz aktivitást. Ezért a MYPT1 C-terminális fragmentumát SDS-poliakrilamid gélben szubsztrátként használva tanulmányoztuk a pulyka zúzából tisztított miozin foszfátáz holoenzimben jelen lévő kinázok foszforiláló hatását. Kimutattuk, hogy ebben a preparátumban a MYPT1-et 35 kDa, 59 kDa és 70 kDa molekulatömegű kinázok foszforilálják. A 35 kDa kináz feltehetően azonos azzal a korábban jellemzett miozin foszfátázzal asszociálódó kinázzal, amelyről ismert, hogy a ZIP-kináz katalitikus régiójához hasonló és a MYPT1-et a gátló helyen képes foszforilálni. Előzetes kísérleteink alapján a 70 kDa enzim a cGMP-függő protein kináz egyik izoformájára specifikus antitesttel adott keresztreakciót. Western-blottal igazoltuk, hogy az 59 kDa enzim az ILK-nak felel meg. Ez arra utal, hogy az ILK a miozin foszfátáz holoenzimmel asszociálva marad számos kromatográfiás elválasztási lépés után is, amely erős kölcsönhatást feltételez a kináz és szubsztrátja között.

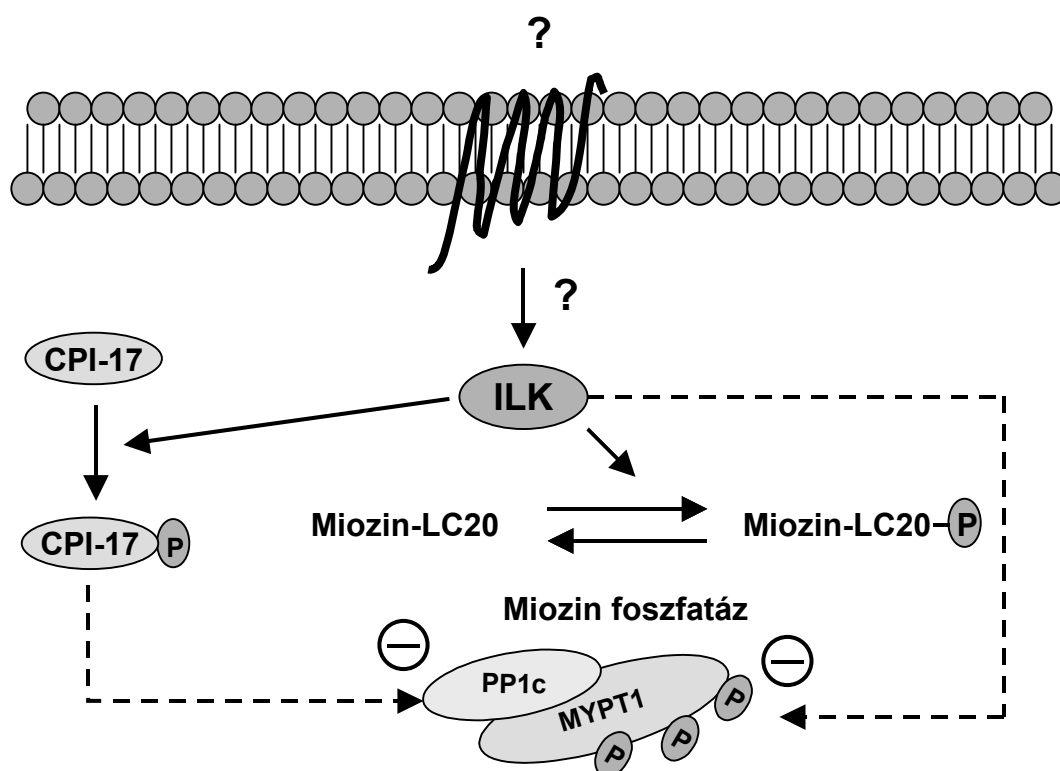
Zúzából tisztított ILK-zal vad típusú és mutáns, baktériumban expresszált (hexahisztidin- (His) vagy GST-fúziós fehérjeként előállított) MYPT1-et foszforiláltunk,

hogy az ILK által a MYPT1-ben foszforilált oldalláncokat jellemezzük. Az ILK nem foszforilálta a His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, viszont 0,8 mol/mol foszfátot épített a His-MYPT1¹⁻⁵¹¹ fragmentumba, ami arra utal, hogy az egyik foszforilációs hely a 296-511 peptidszakaszon található. Az ILK 1,3 mol/mol mértékig foszforilálta a vad típusú GST-MYPT1-et, és ez a foszforiláció 1 mol/mol értékre csökkent a gátló foszforilációs hely (Thr695) alanin mutációját tartalmazó GST-MYPT1^{T695A} szubsztráttal. Az ILK-val foszforilált szubsztrát ehérjék tripszines emésztését követően az elválasztott foszfopeptidek szekvencia analízise a MYPT1-ben a Thr495, a Thr695 és a Thr709 oldalláncok foszforilációjára utalt. A foszfopeptidek mennyiségének viszonya alapján a Thr709 lehet a fő foszforilációs hely, ehhez képest a Thr695 és a Thr495 kisebb mértékben foszforilálódnak.

A MYPT1¹⁻⁵¹¹ és a MYPT1^{T695A} foszforilált formái a defoszforilált fehérjékhez hasonló hatással vannak a PP1c aktivitására. Ezzel szemben a GST-MYPT1 foszforilációjával nagymértékben növekszik a PP1c-t gátló hatás, ami arra utal, hogy a gátló hatás kifejlődése a molekula C-terminális felén található Thr695 oldallánc foszforilációjával arányos. Ezt a foszforilált Thr695-re specifikus antitesttel végzett Western blot analízis is alátámasztotta. A MYPT1 defoszforilált C-terminális régiója (MYPT1⁵¹⁴⁻⁹⁶³) nem kötődik a PP1c-hez. A MYPT1⁵¹⁴⁻⁹⁶³ 32 kDa ZIP-kinázzal vagy ILK-zal foszforilált formái gátolják a PP1c aktivitását. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a gátlás kialakulásában szerepet játszhat a PP1c és a Thr695 oldalláncon foszforilált C-terminális peptidszakasz kölcsönhatása is.

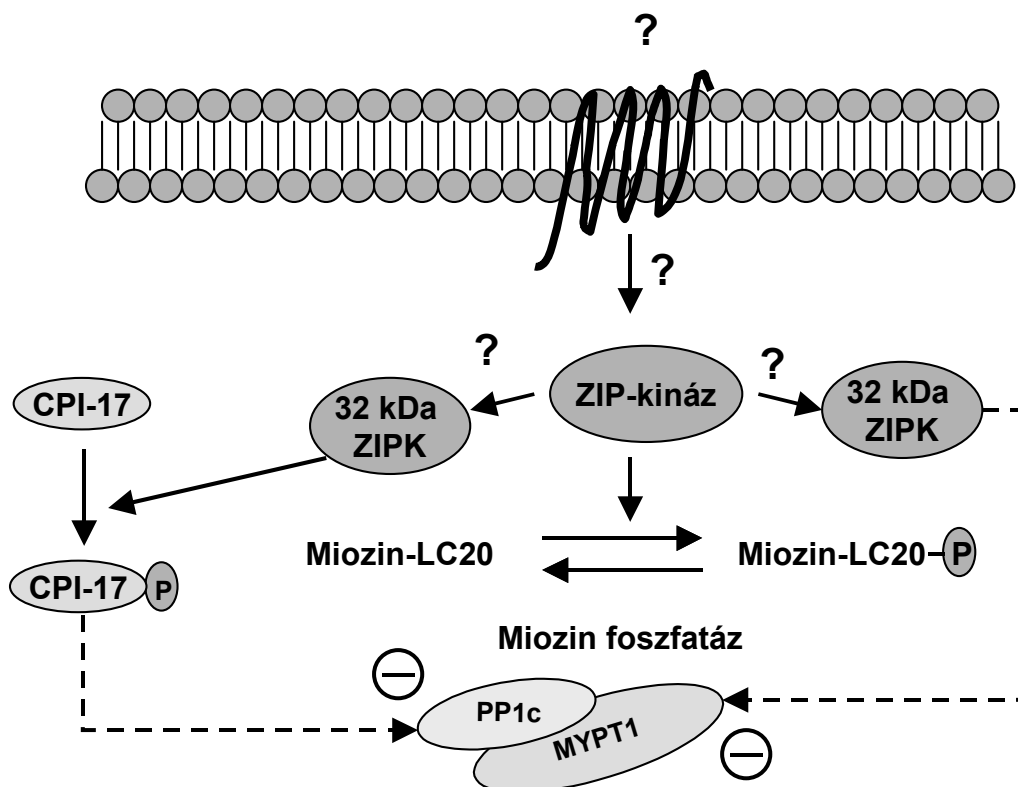
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÓ ÉRTÉKELÉSE

Eredményeink szerint az ILK sokoldalúan szabályozhatja a miozin foszforilációját és ezzel fontos szerepet játszik a simaizmok, ill. a sejtek kontraktilis folyamataiban. Kimutattuk, hogy az ILK részlegesen aktív formája simaizmokban és trombocitákban is előfordul, ahol kontraktilis és citoskeletális fehérjékkel asszociálódik. Az ILK az alábbi séma szerint foszforilálja a miozint és a miozin foszfatáz regulátor alegységét (MYPT1):



A MYPT1 foszforiláció a foszfatáz aktivitás gátlását eredményezve segíti elő a magasabb miozin foszforilációs szint kialakulását. Ezen szabályozási folyamatok, a RhoA/Rho-kináz hatásához hasonlóan, a kontraktilis folyamatok kifejlődését segíthetik alacsony intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációknál. Az ILK a Rho-kinázhoz hasonló hatású abban is, hogy irodalmi adatok szerint a CPI-17 fehérje foszforilációjával is fokozza annak miozin foszfatáz holoenzimet gátló képességét. 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 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.

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 miozin foszforilációt szabályozó szerepe pl. olyan esetekben nyilvánulhat meg, amikor a Ca^{2+} -függő és/vagy a RhoA/Rho-kináz jelátviteli útvonalak nem aktiválódnak. Eredményeink elsősorban *in vitro* adatokkal szolgálnak annak bizonyítására, hogy az ILK és a ZIP-kináz feltételezhetően ilyen funkciót tölt be. Az ILK és a ZIP-kináz jelátviteli folyamatokban történő aktiválódásának mechanizmusát azonban 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. A ZIP-kinázról feltételezik, hogy az enzim dimerizációja szükséges az aktiválódáshoz. Nem ismeretesek azonban a fiziológiai stimulusok és az enzim aktiválódása közötti részfolyamatok. A két enzim jelátviteli folyamatokkal való kapcsolatának kiderítése feltehetően további intenzív kutatások tárgya lesz a közeljövőben.

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 poszterek 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**.

Poszterek:

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., Lontay, B., Serfőző, Z., Erdődi, F.: *A miozin foszfatáz szabályozása és lokalizációja a regulátor alegységre specifikus antitestekkel* Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya, 6. Munkaértekezlete Sárospatak, **2001**

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**