

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

**A MIOZIN FOSZFATÁZ LOKALIZÁCIÓJA ÉS
SZABÁLYOZÁSA NEM-IZOM SEJTEKBEN**

LONTAY BEÁTA

Témavezető: Prof. Dr. Erdődi Ferenc

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2005**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
A protein foszfatáz 1 és 2A holoenzimek szerkezete és szabályozása.....	7
PP1c katalitikus alegység izoformák	7
PP1 szabályozó alegységek	8
A szabályozó alegységek és a PP1c kapcsolata	10
PP2A szerkezete és szabályozása	11
A miozin foszforiláció fiziológiai jelentősége: a miozin kinázok és a MP szabályozó szerepe	12
A miozin foszfatáz szerkezete	14
A MYPT1 alegégszerkezete.....	14
A MYPT izoformák és más MYPT-hez hasonló fehérjék szerkezete	16
A miozin foszfatáz szabályozása.....	17
A miozin foszfatáz gátlása a MYPT1 foszforilációjával	18
A miozin foszfatáz aktiválása.....	18
Az inhibitor fehérjék szabályozó szerepe (CPI-17, PHI-1, PHI-2, KEPI).....	20
A MYPT1 alegység disszociációjának és lokalizációjának szabályozó hatása	21
CÉLKITŰZÉSEK	21
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
Anyagok	23
Állatkísérletek	23
Antitestek.....	23
Fehérjék és peptidek.....	24
Patkány agyrégiók lizátumának preparálása Western blot analízishez.....	24
Primer <i>hippocampus</i> és <i>nucleus cochlearis</i> sejt kultúra preparálása	25
Szinaptoszóma és poszt-szinaptikus denzitás frakciók izolálása patkány agykéregből	25
HepG2 sejt kultúra és a sejtek kezelése inhibitorokkal	26
HepG2 sejtek szubcelluláris frakcióinak preparálása	26
Western blot	28
Protein foszfatáz aktivitásmérés	29
Immunhisztokémia	29
Immunofluoreszcencia és konfokális mikroszkópia.....	30
Immunoprecipitáció.....	31
GST-MYPT pull-down assay	32

Sejtmigrációs vizsgálat.....	32
EREDMÉNYEK.....	33
A MYPT1 és MYPT2 izoformák kimutatása patkány agyban	33
A MYPT1 expressziója különböző patkány agyrégiókban	34
Az agyrégiók miozin foszfátáz aktivitása	34
Immunohisztokémiai vizsgálatok	37
A miozin foszfátáz lokalizációja immunofluoreszcenciával <i>hippocampus</i> és <i>nucleus cochleáris</i> primer sejtkultúrákban	42
MYPT1-kölcsönható neuronális fehérjék azonosítása <i>hippocampus</i> kivonatból immunoprecipitációval....	44
A miozin foszfátáz aktivitás, a MYPT1 és a MYPT1-gyel kölcsönható fehérjék eloszlása a szinaptoszóma és posztzinaptikus denzitás frakciókban	45
A MYPT1 azonosítása és a MP aktivitás meghatározása HepG2 szubcelluláris frakciókban.....	47
A MYPT1 lokalizációjának kimutatása HepG2 sejtekben konfokális mikroszkópiával	48
Az OA hatása a MLC20 és a MYPT1 foszforilációjára	49
Foszforilált MLC20 és foszforilált MYPT1 fehérje lokalizációja konfokális mikroszkóppal.....	50
Az OA hatása a miozin foszfátáz és PP2A aktivitására teljes sejtlyázátumban	52
A ROK, PP2A és a ZIPK lokalizációja HepG2 sejtekben.....	53
Az OA és Y27632 hatása a stresszrostok képződésére.....	54
Az OA és Y27632 hatása a HepG2 sejtek migrációjára	55
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	57
ÖSSZEFOGLALÁS	67
SUMMARY.....	68
IRODALOMJEGYZÉK	70
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	82
FÜGGELÉK	83

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP	alkalikus foszfatáz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP- γ S	adenozin-5'-O-(γ -tio)trifoszfát
BCA	bikinkoniniksav
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát
BSA	borjú szérum albumin
[Ca ²⁺] _i	intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció
CaM	Ca ²⁺ -kalmodulin
CaMK-II	kalmodulin-függő kináz-II
cAMP	ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát
cGMP	ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát
CK-2	kazein kináz-2
CLSM	konfokális lézer pásztázó mikroszkópia
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
DARPP-32	32 kDa dopamin és cAMP által szabályzott foszfoprotein
D-MEM	Dulbecco minimális esszenciális tápfolyadék
ECL	nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló reagens
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGTA	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
FBS	marhaszérum
FITC	fluorescein-izotiocianát
G _L	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége májban
G _M	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége vázizomban
GST-MYPT	glutation-S-traszferez-MYPT fúziós fehérje
GTP- γ S	guanozin-5'-O-(γ -tio)trifoszfát
HepG2	humán hepatokarcinóma
HGF	hepatocita növekedési faktor
HRP	torma peroxidáz
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
ILK	integrinekhez kapcsolódó kináz
IP	immunoprecipitáció
KEPI	kináz által aktivált PP1 inhibitor
M20	a miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége
MDPK	Cdc42-kötő miotónikus disztrófia kináz
MEM	minimális esszenciális tápfolyadék
MLC20	a miozin 20 kDa könnyűlánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MP	miozin foszfatáz
MYPT	miozin foszfatáz regulátor alegység
NBT	nitroblue-tetrazolium klorid
NIPP-1	nukleáris protein foszfatáz inhibitor-1
OA	okadainsav
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PAK	p21-aktivált protein kináz
PBS	foszfát puffer

PFA	paraformaldehid
PGF2 α	prosztaglandin F2 α
PHI-1	foszfatáz holoenzim inhibitor-1
PJ	propídium-jodid
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PKGI α	cGMP-függő protein kináz I α
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység
PP2A	protein foszfatáz-2A
PP2B	protein foszfatáz 2B
PP2C	protein foszfatáz 2C
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
ROK	RhoA aktivált protein kináz
SDS	nátrium-dodecilszulfát
TBS	Tris-HCl puffer
ZIPK	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz

BEVEZETÉS

Az eukarióta szervezetek sejtfolymatainak alapvető szabályozási mechanizmusa a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. Becslések szerint a fehérjék mintegy harmada tartalmaz kovalensen kötött foszfátot (Hunter, 1995). A protein kinázok a fehérjék foszforilációját katalizálják, amely során nukleozid-trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfátcsoportját építik be szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncokba (Cohen P., 1989). A foszforiláció reverzibilitását a protein foszfatázok (PP) biztosítják a fehérjékben észterkötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisével.

A humán genom körülbelül 500 protein kinázt kódol. Ezek kb. kétharmada Ser/Thr-specifikus kináz. Protein foszfatáz katalitikus alegységet kb.150 gén kódol, ezek közül mintegy 40 Ser/Thr specifikus protein foszfatáz (Nemzetközi Humán Genom Szekvenáló Konzorcium, Cohen, 2002). A protein kinázok többségénél ismert a szekvencia-specifititás, és statisztikai analízisek alapján szinte kizárólagos Ser/Thr illetve Tyr specifititás állapítható meg (Kreegipuu és mtsai., 1998). A protein foszfatáz katalitikus alegységek viszonylag kis számát a katalitikus alegyékkel holoenzimet alkotó és hozzájuk kapcsolódó szabályozó alegységek kompenzálják. A szabályozó (regulátor) alegységek a holoenzim szubsztrát-specifititását, valamint katalitikus aktivitását befolyásolják, mivel a katalitikus alegységhez és a szubsztráthoz is kötődve az enzimeket különböző szubcelluláris kompartmentekhez irányítják. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok családját a PP1, PP2A, PP2B (kalcineurin), PP2C, PP4, PP6, PP5 és PP7 enzimek alkotják (Barton és mtsai, 1994; Cohen, 1997). Ezek közül kiemelkedő fontosságúnak tekinthetők a PP1 és PP2A enzim, amelyek a sejtekben viszonylag nagy koncentrációban fordulnak elő és számos biológiai folyamatot szabályoznak.

A miozin foszfatáz (MP) a PP1 enzimcsalád tagja, amely egy PP1 katalitikus alegységből (PP1c), egy miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (myosin phosphatase target subunit, MYPT) és egy eddig még ismeretlen funkciójú 20 kDa fehérjéből áll. Az enzim szubsztrát-specifitititásban és aktivitásának szabályozásában a MYPT játszik döntő szerepet. A miozin foszfatázt először izomszövetekben jellemezték, és szerepét a kontraktilitás szabályozásában ismerték fel, amely a miozin 20 kDa molekulatömegű könnyűlánc (MLC20) defoszforilációja által valósul meg. Munkám célja a miozin foszfatáz kimutatásának, sejten belüli lokalizációjának, szabályozási lehetőségeinek és a sejtfolymatokban betöltött szerepének feltárása volt nem-izom szövetekben és sejtekben (agyszövet, hepatocita), ahol a miozin foszfatázt eddig még nem jellemezték.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A PROTEIN FOSZFATÁZ 1 ÉS 2A HOLOENZIMEK SZERKEZETE ÉS SZABÁLYOZÁSA

PP1c katalitikus alegység izoformák

A protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegység (PP1c) (35-38 kDa) az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje. A PP1 a foszfohidrolázok olyan szupercsaládját alkotja, amely mindhárom nagy filogenetikai csoportban (eubaktériumok, archeák és eukarióták) jelen van. A legtöbb prokariótában nincsenek vagy csak néhány foszfatázt találunk, míg az evolúció során az eukariótáknál a protein foszfatázok, kiváltképp a Ser/Thr specifikus protein foszfatázok száma ugrásszerűen megnőtt. A PP1 katalitikus alegységek nagy szekvencia-homológiát mutatnak, így a filogenetikailag korán leágazott *Gardia lambia* protein foszfatáza is 72 %-os homológiát mutat az emlős PP1 izoformákkal. A legtöbb eukariótában több gén kódol PP1c izoformákat, így az *Arabidopsis thaliana* nyolc PP1-et kódoló gént tartalmaz. Ezzel szemben a *Saccharomyces cerevisiae* csak egy PP1c-t (Glc7) kódol (Dombrádi, 1997). Az emlősökben három PP1 gén található: PP1 α , PP1 γ és PP1 β/δ . A PP1 γ izoformának két alternatív splicing-gal képződő variánsa van: a PP1 γ_1 és a PP1 γ_2 (Cohen, 1988; Dombrádi és mtsai., 1990; Sasaki és mtsai., 1990). A PP1 α -nak szintén két splice variánsa van, a PP1 α_1 és PP1 α_2 (Durfee és mtsai., 1993), amelyek létezését a humán genom szekvenciáinak elemzése is alátámasztotta (Ensembl, ENSP0000176139). A PP1 γ_2 a tesztiszben és agyban expresszálódik, más szövetekben az összes emlős izoforma általánosan előfordul, de eltérő sejten belüli lokalizációt mutatnak.

A PP1c kristályszerkezetét a mikrocisztin inhibitorral (Goldberg és mtsai., 1995), foszfát analóggal (Egloff és mtsai., 1995), a glikogén-kötő alegység rövid peptidszakaszával (Egloff és mtsai., 1997) és a MYPT szabályozó alegység N-terminális peptidjével (Terrak és mtsai., 2004) kristályosítva határozták meg. A PP1c N- és C-szubdoménokra tagolható. Az N-szubdomén kompakt szerkezetet alkot, és magában foglalja az enzimaktivitás szabályozásában szerepet játszó aktív centrumot annak két fémionjával. Az aktív centrum az N-szubdomén Y-alakú katalitikus árkában helyezkedik el. A katalitikus árok három ága, a C-terminális, a hidrofób-, illetve a savas-árok közül az utóbbi kettőnek van jelentősége a szubsztrátok kötésében. A C-szubdomén rendezetlen szerkezetű, a szubsztrát és inhibitor fehérjék lehetséges kötőhelye. A PP1c izoformák aminosav szekvenciájának hasonlósága közel 90 %-os, ezért a PP1 holoenzimek széles szubsztrátspecifitása arra utal, hogy elsősorban a PP1 holoenzim szabályozó alegysége az, amely meghatározza a PP1

funkcióinak tág spektrumát. A PP1c katalitikus aktivitását a hozzá kötődő inhibitor fehérjék mellett mikroorganizmusok és rovarok által termelt sejtporotokébilis toxinok is gátolhatják. Ilyen a mikrocisztin LR, egy ciklikus hexapeptid, amely részben a két fémion által kötött vízmolekulával lép kapcsolatba, valamint a hidrofób árokban kötődve lefedi a katalitikus centrumot is, ezzel gátolja a foszfoszubsztrát kötődését és hidrolízisét. A mikrocisztin által kialakuló gátlás irreverzibilis, ugyanis a mikrocisztin kovalens kapcsolatot is létesít a katalitikus alegységgel, habár ez a kötés a gátlásnak nem feltétele. A poliéter okadainsav (OA) a hidrofób árokhoz kötődik, és hidrogén-kötést alakít ki a Tyr-272-vel, amely a katalitikus centrum része. Ezek a toxinok fontosak a PP1 és PP2A enzimek homeosztázist fenntartó szerepének vizsgálataiban is.

PP1 szabályozó alegységek

Feltételezések szerint a PP1c a sejtben szabadon legfeljebb átmenetileg létezhet, inkább különböző szabályozó alegységekhez kapcsolódva holoenzim formában fordul elő. Eddig közel 50 szabályozó alegységet írtak le, de a humán genom szekvencia elemzése alapján még további PP1-kötő fehérjék jelenléte feltételezhető emlős sejtekben (Ceulemans és mtsai., 2001).

A szabályozó alegységek közül megkülönböztetünk elsődleges alegységeket, másodlagos kötő fehérjéket illetve modulátor/inhibitor fehérjéket. Az elsődleges szabályozó alegységek a PP1c-vel létrehozott holoenzimet adott szubsztráthoz, illetve szubcelluláris kompartmenthez irányítják. Így ezeket a „célpont” szerint csoportosítva megkülönböztetünk glikogénhez (G_M , R5), miozinhoz (MYPT1, MYPT2, p85), a spliceszóma/RNS-hez (NIPP, p99), a citoszkeletonhoz (neurabin, spinofilin), valamint a centroszóma (AKAP350) irányító szabályozó alegységeket (*1. táblázat*). A glikogénhez is kötődő PP1c-kötő fehérje sokféle lehet, így pl. emlősökben G_M , G_L , R5/PTG és R6 fehérjéket azonosítottak (Doherty és mtsai., 1995; Armstrong és mtsai., 1997). Az eddig leírt glikogén-kötő alegységek N-terminális részén egy poliszacharid kötő motívumot is azonosítottak (Wu és mtsai., 1998). A G_L alegység a májban, a G_M alegység a szív-és vázizmokban, az R5/PTG és R6 számos szövetben irányítja a PP1c-t a glikogén partikulákhoz. A G_M alegység (128 kDa) három, a glikogén anyagcserében szerepet játszó glikogénkötő enzimhez (glikogén foszforiláz, foszforiláz kináz és glikogén szintetáz) irányítja a PP1c-t. A PP1c aktivitása a PP1c- G_M komplexben nyolcszorosára nő, és kevésbé lesz érzékeny a citoszolikus inhibitorokra (Hubbard és Cohen, 1989).

A sejtmagban a NIPP (45 kDa) és PNUTS/p99 inhibitor fehérjék (99 kDa) a PP1c-t a pre-mRNS-hez irányítják (Jagiello és mtsai., 1997), így feltételezhető, hogy a PP1 eddig nem jellemzett, a transzkripcióban is szerepet játszó fehérje defoszforilációjában is jelentős. A PP1-NIPP-1 komplexben a kölcsönhatások reverzibilis foszforilációval szabályozhatók. A cAMP-függő protein kináz (PKA) a Ser199 és Ser178, míg a kazein kináz-2 (CK-2) a Ser204 és Thr161 oldalláncokon foszforilálja a NIPP alegységet. Bármely kináz által történő foszfo-

1. táblázat A protein foszfatáz-1 szabályozó alegységek osztályozása

Szabályozó alegység	Élettani szerep	Szövet/sejten belüli lokalizáció
ELSŐDLEGES ALEGYSÉGEK		
Glikogénhez irányítás G _M G _L R5 R6	glikogén anyagcsere	vázizom, szív, glikogén partikulák máj, glikogén partikulák általánosan expresszáldó általánosan expresszáldó
Miozinhoz/aktinhoz irányítás MYPT1 MYPT2 p85	simaizom kontrakció vázizom kontrakció aktin citoskeleton	simaizom és nem-izom szövetek vázizom, szív, miofibrillumok széleskörűen elterjedt
RNS-hez irányítás NIPP HCF p99	pre-mRNS splicing transzkripció RNS érés és szállítás	széleskörben elterjedt, sejtmag széleskörben elterjedt, sejtmag széleskörben elterjedt
Plazmamembránhoz és citoskeletonhoz irányítás Neurabin I Spinofilin AKAP220	szinapszisok morfológiája szinaptikus jelátvitel PKA és PP1 koordináció	neuronális, plazmamembr. és aktin citoskeleton. általánosan expresszáldó, plazmamembr. agy, here, peroxiszóma/citoskeleton
Centroszómához irányítás AKAP350	centroszóma működése	általánosan expresszáldó, centroszóma
MÁSODLAGOS KÖTŐ FEHÉRJÉK		
Nukleáris membránhoz irányítás AKAP149	sejtmag membrán újraszerveződés	általánosan elterjedt, sejtmag membrán
Centroszómához irányítás Nek2	centroszóma szétválás	általánosan expresszáldó, centroszóma és citoplazma
Mitokondriumhoz irányítás Bcl-2	apoptózis	általánosan expresszáldó, mitokondriális membrán
MODULÁTOR/INHIBITOR FEHÉRJÉK		
I-1 DARPP-32 I-2 CPI-17 PHI-1 PHI-2 KEPI	PP1c gátlása PP1c gátlása PP1c gátlása, chaperon PP1c gátlása PP1 holoenzim gátlása PP1 holoenzim gátlása PP1 holoenzim gátlása	általánosan expresszáldó, citoszol agy, vese, citoszol általánosan expresszáldó, citoszol és nukleusz simaizom általánosan expresszáldó szívizom szívizom

riláció a PP1c-NIPP holoenzim aktiválását eredményezi (Vultseke és mtsai., 1997). A miozin foszfataz enzimen a PP1c katalitikus alegységhez miozinhoz irányító MYPT alegység kötődik. A miozin foszfataz szerkezetének és szabályozásának részletes kifejtése a következő fejezetekben található.

A másodlagos kötő fehérjék csak a PP1c-kötőhellyel rendelkeznek, szubsztrát-kötőhellyel nem, így sok esetben ezek a fehérjék az enzim szubsztrátjai (Ceulemans és mtsai., 2002). Ilyen például a retinoblasztóma fehérje, a NimA-függő kináz 2 (Nek2), az AKAP149 vagy a Bcl-2.

A modulátor alegységek legtöbbször viszonylag kis molekulatömegű (14-32 kDa), hőstabil inhibitor fehérjék (I-1, DARPP-32, CPI-17, G-szubsztrát stb.). Ezek nem a PP1c célra irányításában vesznek részt, hanem a PP1c-hez kötődve szabályozzák annak aktivitását. A citoszolikus inhibitor-1 (I-1), a DARPP-32 (32 kDa dopamin és cAMP által szabályzott foszforprotein), valamint a CPI-17 (17 kDa PKC által aktivált inhibitor) PP1c gátló hatása a treonin oldalláncukon történő foszforilációtól függ (Cohen PTW., 2002). Az I-1 és DARPP-32 a PKA, míg a CPI-17 a PKC (protein kináz C) által foszforilálható. Az inhibitor fehérjékben a foszforilált treonin és a környezetében lévő aminosavak szubsztrátanalóggént viselkedve a PP1c katalitikus centrumának közelében kötődnek és gátolják az enzim aktivitását (Goldberg és mtsai., 1995). Az I-1 általánosan előforduló fehérje, míg a DARPP-32 expressziója elsősorban az agyra jellemző. A CPI-17 a simaizomban és agyban fordul elő, és a miozin foszfatazra specifikus inhibitornak tekintik (bővebben ld. 20. oldal). Az inhibitor-2 (I-2) az eddigiekkel ellentétben defoszforilált állapotban gátolja a PP1c aktivitását. Korábbi hipotézisek szerint a PP1c-I-2 komplex citoszolikus PP1c raktárként funkcionálhat. Az I-2 segít a PP1c natív térszerkezetének kialakításában, ezzel tehát dajkafehérje (chaperon) funkciót is betölthet (Alessi és mtsai., 1993; MacKintosh és mtsai., 1996).

A szabályozó alegységek és a PP1c kapcsolata

A regulátor fehérjék rendkívül változatosak, jelentősebb szekvencia-homológia csak izoformák esetén található, ezért számítógépes adatbázis segítségével történő keresésük nehéz. A nagyfokú változatosság ellenére azonban csaknem mindegyik szabályozó alegység tartalmaz egy rövid szekvenciamotívumot (K/R-x1-V/I-X2-F/W, a továbbiakban RVxF motívum), amely specifikus kötődést biztosít a katalitikus alegységhez (Endo és mtsai., 1996; Egloff és mtsai., 1997). A humán genom által kódolt fehérjék több mint 10%-ában megtalálható a degenerált RVxF motívum, mégis a valódi PP1c-kötő fehérjék száma viszonylag kevés. A glikogénhez irányító G_M alegység kötőmotívumot és környezetét is

tartalmazó 13 aminosavból álló peptidjének PP1c-vel történő együttes kristályosítása és röntgenkristallográfiás vizsgálata megerősítette az RVxF motívum esszenciális szerepét a kölcsönhatásban. Az RVxF motívum a PP1c katalitikus centrumától távol lévő hidrofób zsebhez kötődik (Egloff és mtsai., 1997), a kötődést a kötőmotívumot megelőző bázikus aminosavak és a PP1c savas oldalláncai között kialakuló kapcsolatok is erősítik.

PP2A szerkezete és szabályozása

A PP2A Ser/Thr specifikus multimer enzim, amelynek katalitikus alegysége (PP2Ac) az evolúció során szerkezetét nagymértékben megtartotta, így a hasadó élesztőgombák és a humán PP2A katalitikus alegysége is 86% szekvencia-homológiát mutat. A PP2A szerepet játszhat a sejten belüli anyagcsere-folyamatokban, a DNS replikációban, a transzkripcióban, az RNS splicingban, a transzlációban, a sejtciklusban és a morfogenezisben is (Wera és Hemmings, 1995). A PP2A számos összetett protein kináz kaszkádot szabályoz: a kinázok közül a PKA (Liau és Steinberg, 1996), a PKB (protein kináz B) (Andjelkovic és mtsai., 1996), a PKC (Ricciarelli és Azzi, 1998), a CaMK-II (kalmodulin függő kináz II) (Barnes és mtsai., 1995) is defoszforilálódik PP2A által. A PP2A sokoldalú hatása, a PP1 enzimsaládhoz hasonlóan, annak tulajdonítható, hogy a katalitikus alegység sokféle szabályozó alegységgel léphet kölcsönhatásba. Szerkezetükre jellemző, hogy katalitikus alegységből (C, PP2Ac), 65 kDa A (PR65 alegység) és egy B szabályozó alegységből állnak. Az A alegység szerepe a további szabályozó alegységek és fehérjék toborzása az A-C dimerhez. A B alegység három formáját mutatták ki (B, B' és B'' vagy PR55, PR61 és PR72). Mindhárom B alegység további izoformái is léteznek, így összességében több mint 50 különböző trimer holoenzim jöhet létre ezek variánsaiként (Millward és mtsai., 1999).

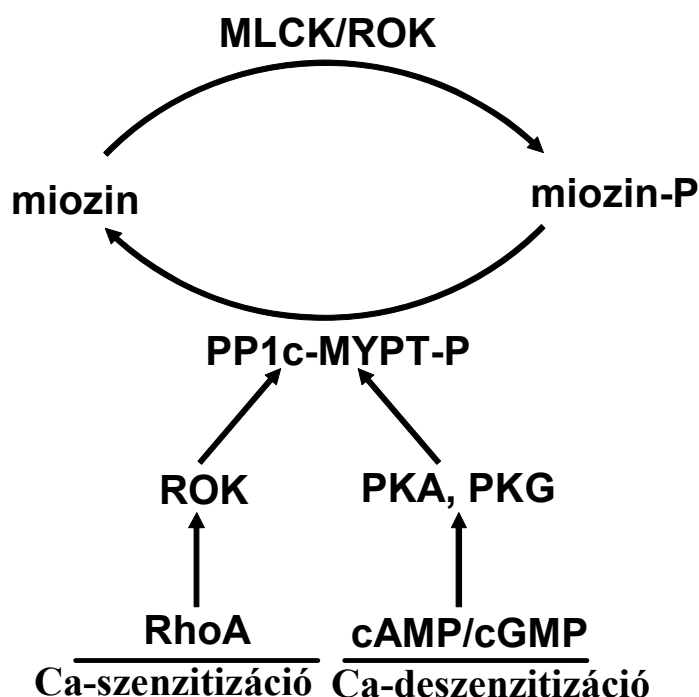
Számos virális fehérje alkot komplexet a PP2A-val, módosítva annak aktivitását és szubsztrátspecifitását. Így például az SV40 kis *t* antigén, helyettesítheti a B alegységet és gátolja a PP2A aktivitást (Kamibayashi és Mumby, 1995), míg két HIV-kódolt fehérje, az Ncp7 és Vpr, közvetlenül kötődik a PR61-et tartalmazó trimerhez, és aktiválja azt (Tung és mtsai., 1997). A PP1 enzimekkel ellentétben a PP2A holoenzim aktivitását az I-1 és I-2 fehérjék nem befolyásolják. A PP2A aktivitásához extra fémion nem szükséges, a PP2B Ca^{2+} és a PP2C Mg^{2+} -függő működésével ellentétben. A membránpermeabilis toxinok közül az OA a PP2A-t alacsonyabb koncentrációban gátolja ($\text{IC}_{50} = 0,2 \text{ nM}$), mint a PP1 enzimet ($\text{IC}_{50} = 50\text{-}100 \text{ nM}$) *in vitro*. *In vivo* az OA a PP1 enzimre még 100 nM-nál nagyobb koncentrációban sem hat, ezzel szemben a PP2A gátlás már 5-50 nM OA-val is megfigyelték (Favre és mtsai., 1997).

A MIOZIN FOSZFORILÁCIÓ FIZIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE: A MIOZIN KINÁZOK ÉS A MIOZIN FOSZFATÁZ SZABÁLYOZÓ SZEREPE

Az elsősorban simaizomban és a legtöbb nem-izom sejtben is megtalálható miozin izoforma, a miozin-II foszforilációja sokféle sejt folyamatban játszik kulcsszerepet, mint pl. a simaizom és nem-izom sejtek kontrakciójában, a sejtek motilitásában, adhéziójában, a citokinézisben, a citoszkeleton átrendeződésében, a trombociták aktiválásban és különböző ioncsatornák szabályozásában. A miozin II az aktinnal asszociálódó motoros fehérje, amely két miozin II nehézláncból (200-204 kDa) és a nehézláncokhoz kapcsolódó két könnyűláncból (17 kDa és 20 kDa) áll. A miozin 20 kDa könnyű láncának (MLC20) foszforilációja az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja, míg a miozin foszfatáz által történő defoszforiláció elernyedést (relaxációt) eredményez. A sejtekben az aktin-citoszkeleton szerveződése és annak dinamizmusa szintén reverzibilis protein foszforilációval szabályozódik, amelynek egyik legfontosabb eleme az MLC20 foszforilációja. A MLC20 foszforilációjának növekedése a sejtekben fokozza a stresszrostok és fokális adhéziók kialakulását, ezzel szemben defoszforilációja ezek felbomlását idézi elő.

A miozin foszforilációs szintje tehát számos sejt folyamatban alapvető szabályozó tényező: a foszforiláció mértékét a miozint foszforiláló kinázok és a defoszforilációt katalizáló miozin foszfatáz aktivitásának aránya szabja meg. A kinázok és a miozin foszfatáz aktivitása sokoldalúan, számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozható. Ezen szabályozási mechanizmusok tanulmányozásának modelljéül sokáig a simaizom kontrakciós folyamatok vizsgálata szolgált. A miozin foszforiláció/defoszforiláció számos simaizomhoz kötött funkciót szabályoz, így a vaszkuláris tónust, a gasztrointesztinális motilitást, a hörgőasztmát és a méhösszehúzódást is. Ezáltal szerepe van a vaszkuláris simaizom hiperkontraktilitásban, ami magas vérnyomásban, koronáriás görcsben és kisagyi érgörcsben fejeződik ki (Somlyó és Somlyó, 2003; Ceulemans és Bollen, 2004). A simaizom kontrakció és a miozin foszforiláció klasszikus elmélete szerint agonisták hatására, illetve a membrán depolarizációjával növekszik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), amely Ca^{2+} -kalmodulin (CaM) komplex kialakulását eredményezve növeli a CaM-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) aktivitását. Ezzel az MLCK/MP aktivitás arány növekszik, ami a miozin foszforilációs szintjének emelkedését és izomösszehúzódást eredményez. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenésével a kináz/foszfatáz aktivitás arány csökken, és előtérbe kerül a miozin defoszforilációja, amelynek révén az izom relaxációja következik be. E mechanizmusban a miozin foszfatáz szerepéről azt feltételezték, hogy a miozin defoszforilációjával mindössze a

folyamat reverzibilitását biztosítja. A miozin foszfatáz szabályozásának az izomösszehúzódsban játszott alapvető szerepére azok a kísérletek hívták fel a figyelmet, amelynek során kimutatták, hogy a foszfatáz membránpermeábilis toxinokkal történő gátlása önmagában is izomkontrakciót és miozin foszforilációt indukál, alacsony $[Ca^{2+}]_i$ és MLCK aktivitás mellett is (Takai és mtsai., 1987). A foszfatáz gátlás jelentőségén kívül (amely mű-



1.ábra A miozin foszforilációt szabályozó tényezők.

ködő miozin kináz hiányában nem lenne elégséges a foszforilációs szint növeléséhez) ezek a kísérletek arra is felhívták a figyelmet, hogy az MLCK mellett más, Ca^{2+} -tól független kinázok is részt vehetnek a miozin foszforilációjában. A foszfatáz inhibitorokhoz hasonló hatást figyeltek meg, azaz foszfatáz-gátlást és alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett megvalósuló miozin foszforilációt lassú és fenntartott kontrakcióval, $GTP\gamma S$ -el kezelt permeabilizált simaizmokban. A folyamat molekuláris hátterét tanulmányozva kimutatták, hogy a $GTP\gamma S$ a GTP -kötő RhoA fehérjét aktiválja, amely a RhoA aktivált protein kináz (ROK) aktivitását növeli. A ROK foszforilálja a miozint és a miozin foszfatáz MYPT alegységét. Ez utóbbi foszforiláció a miozin foszfatáz gátlását eredményezve segíti elő a miozin foszforilációs szintjének növekedését. Az állandó (és viszonylag alacsony) $[Ca^{2+}]_i$ jelenlétében a foszfatáz gátlásával párhuzamosan kifejlődő kontrakció és miozin foszforiláció jelenségét Ca^{2+} -szenzitizációnak nevezik. Ezzel szemben a miozin foszfatáz aktiválása Ca^{2+} -deszenzitizációt

okoz. Ez a hatás gyakran a ciklikus nukleotidok (cAMP, cGMP) intracelluláris szintjének növekedéséhez, illetve ezen hírvivők által aktivált protein kinázokhoz (PKA, PKG) kötött, de a mechanizmus még nem minden részletében tisztázott.

Mindezen megfigyelések a miozin foszfataz szabályozó hatásának fontosságára utaltak, és részben ennek tulajdonítható az utóbbi évtized aktív kutatómunkája, amely az enzim szerkezetének és szabályozási lehetőségeinek megismerésére irányult.

A MIOZIN FOSZFATÁZ SZERKEZETE

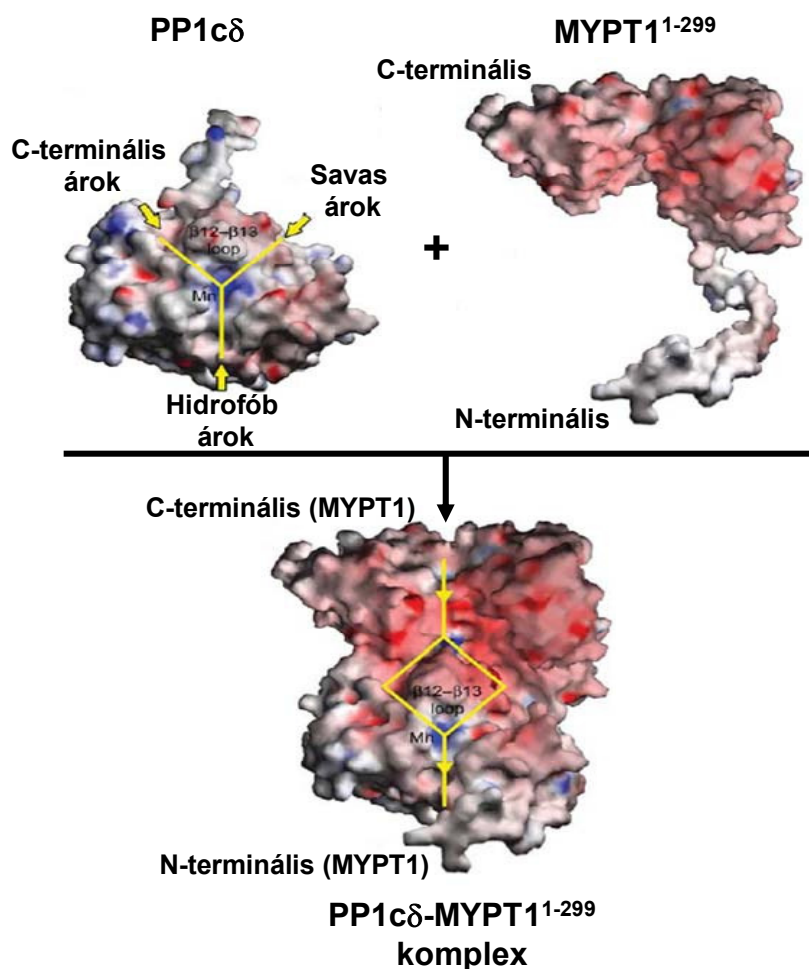
A MYPT1 alegységszerkezete

A MYPT1 alegységeket elsőként csirke zúza (Shimizu és mtsai., 1994) és patkány aorta (Chen és mtsai., 1994) könyvtárból klónozták, és kimutatták egy hosszabb (133 Da) és rövidebb (110-130 kDa) izoforma létezését is. A miozin foszfataz heterotrimer, amely egy 38 kDa katalitikus alegységből (általában PP1c δ), egy 110-130 kDa szabályozó alegységből (MYPT1) és egy 20 kDa alegységből áll (M20) (Hartshorne és mtsai., 2004). A MYPT1-ben az N-terminális peptidszakaszok kötődnek a PP1c δ -hez, a MYPT1 C-terminális vége (934-1006) az M20-szal való kölcsönhatásban játszik szerepet. A MYPT1 több izoformáját számos fajból klónozták. A különböző MYPT1 izoformák splice variánsok, melyek ugyanarról a génről íródnak át, és a 12q15-q21.2 humán kromoszómán találhatók. A kazetta-típusú splice variánsok közötti különbségek a középső inzert (123 nukleotid, 512-552 inzert) illetve a leucin cipzár jelenlétének illetve hiányának tulajdoníthatók.

A MYPT1 jellegzetes része az N-terminális részen található PP1c-kötő motívum (³⁵KVKF³⁸). Elsődlegesen ez a szekvencia felelős a PP1c δ kötéséért, de másodlagosan más MYPT szakaszok is szerepet játszhatnak a holoenzim kölcsönhatásainak kialakításában. A kötőmotívummal való kölcsönhatás esszenciális a PP1c-MYPT komplex kialakulásában. A kötőmotívum kapcsolódása indukálja az 1-22 aminosavból álló peptidszakasz, az ankirin-szerű ismétlődések, valamint a 304-511 peptidszakaszok kooperatív kötődését (Tóth és mtsai., 2000a). Ezeket a kölcsönhatásokat a MYPT¹⁻²⁹⁹ fragmentumból és a PP1c δ -ból álló komplex kristályosítása és röntgenszerkezeti vizsgálata által is bizonyította.

A MYPT1 2560 Å² felszínen érintkezik a PP1c δ -val, és ez a kölcsönhatás a PP1c δ Y-alakú katalitikus árkának szerkezeti újrarendeződéséhez vezet. A katalitikus árok meghosszabbításával a kialakult holoenzim katalitikus aktivitása nő (Terrak és mtsai., 2004). A kötőmotívumot követi a hét ankirin-szerű ismétlődés, amely konzervatív β -hajtú kanyar-hélix-hurok-hélix ($\beta_2\alpha_2$) szerkezetű és a MYPT izoformák legkonzerváltabb régiója

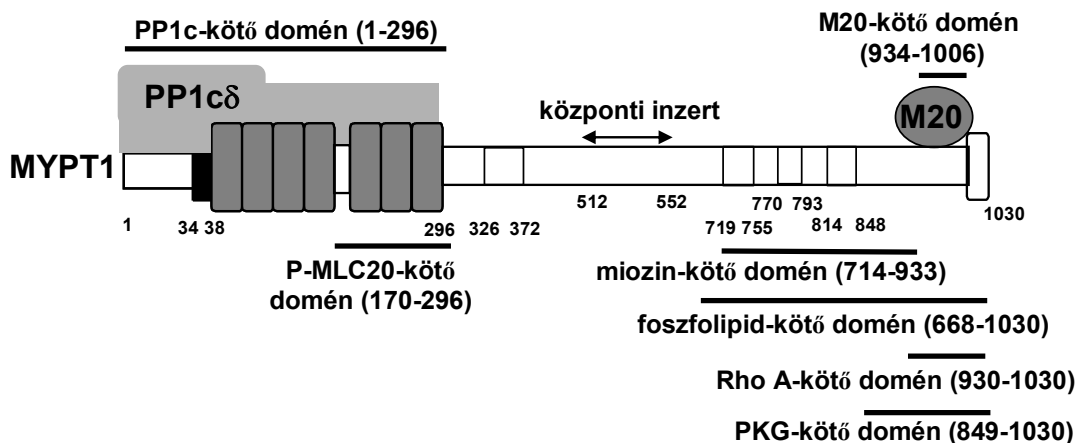
(Sedgwick és Smerdon, 1999). Számos fehérje létesít kölcsönhatást ezzel a peptidszakasszal, így e fehérjeszakasz kölcsönható felszínként is szolgál. A MYPT1 fehérje-biokémiaailag jól jellemezhető; elkülönülő szakaszai a 326-372 aminosavak közötti savas aminosavakban gaz-



2. ábra. A $PP1c\delta$ - $MYPT^{1-299}$ komplex elektrosztatikus felszín megjelenítése.

dag régió, a 719-755 és a 814-848 aminosavak között található ionos szakaszok, a Ser/Thr-ban gazdag 770-793 aminosavak által bezárt szakasz, valamint a molekula közepén található inzert (512-553), amely a splice-variánsok eltérő molekulatömegű izoformáit eredményezi. A C-terminális jellemző szakasza a leucin cipzár motívum (1006-1030), amely azonban nem mindegyik izoformában fordul elő. A MYPT1 a miozin foszfatáz elsődleges szubsztrátjával, a foszforilált miozinnal és az MLC20-szal az ankirin-szerű ismétlődéseken keresztül kötődik (170-296) (Hirano és mtsai., 1997). A defoszforilált formával való kölcsönhatása kevésbé stabil, ezért feltehetően a C-terminális (714-933) peptidszakasz lehet felelős (Johnson és mtsai., 1997). A miozin mellett az adducin (α , β , γ) (Amano és mtsai., 2000), Tau és MAP2

(Amano és mtsai., 2003) fehérjék is kötődhetnek a MYPT1-hez az ankirin-szerű ismétlődéseken keresztül. Ezeket a fehérjéket a ROK foszforilálja, defoszforilációjukat a miozin foszfatáz katalizálja. A MYPT1 C-terminális részéhez (668-1030) savas foszfolipidek kötődnek, amelyek gátolják a PP1c aktivitást, de ez a kölcsönhatás gyengül a MYPT1 PKA-



3. ábra A MYPT1 izoforma humán szekvencián alapuló szerkezete.

által történő foszforilációval (Hartshorne és mtsai., 1998). Szintén a MYPT1 C-terminális része (930-1030) lép kölcsönhatásba a GTP-RhoA-val (Kimura és mtsai., 1996). A cGMP-függő protein kináz I α (PKG I α) a MYPT1 849-1030 peptidszakaszával alakít ki kölcsönhatást. A cGMP koncentrációjának növekedésének hatására a miozin foszfatáz a PKG I α -t a simaizomban kontraktilis elemekhez irányítja és relaxációt vált ki (Ito és mtsai., 2004). A moezin szintén a MYPT1 C-terminális peptidszakaszaihoz kötődik (Amano és mtsai., 2000) és hasonlóan az adducinhoz és Tau fehérjékhez, ROK által foszforilálható és miozin foszfatáz által defoszforilálható. A MYPT1 leucin cipzár motívuma (1000-1030) az IL-16 prekursor molekula PDZ doménjához (Bannert és mtsai., 2003), valamint a RhoA-kölcsönható fehérje coiled-coil doménjához is kötődhet (Surks és mtsai., 2003).

A MYPT izoformák és más MYPT-hez hasonló fehérjék szerkezete

A részletesebben tanulmányozott MYPT1 mellett ismertek más MYPT izoformák és MYPT-hez hasonló irányító fehérjék is. Valamennyiben közös az N-terminális részen lévő ankirin-szerű ismétlődések jelenléte és az RVxF PP1c-kötő motívum megléte.

A MYPT2-t humán agy könyvtárból klónozták MYPT1-en alapuló cDNS próbát használva. A 982 aminosavból álló, 110 kDa MYPT2 61% szekvencia-homológiát mutat a MYPT1-gyel (Fujioka és mtsai., 1998). Alternatív splicing-gal MYPT2A és MYPT2B izoformák alakulhatnak ki, mindkettő tartalmaz leucin cipzárt, de a csaknem minden sejtben expresszáldó MYPT1-gyel ellentétben a MYPT2 szív- és vázizom-, valamint agyspecifikus.

Egy másik, MYPT-hez hasonló fehérje az MBS85, amely általánosan expresszáldó fehérje, de nagyobb mennyiségben a szívizomban van jelen (Tan és mtsai., 2001). Specifikusan a PP1c δ izoformát köti és defoszforilálja a foszforilált miozint. A MBS85 fehérjét tartalmazó holoenzim aktivitását gátolja a Thr-560 oldallánc Cdc42-kötő miotónikus disztrófia kináz (MDPK) vagy a ROK által történő foszforilációja.

A MYPT3 (58 kDa) mindössze 30-40%-os homológiát mutat a MYPT1 szabályozó alegységgel. A fehérje N-terminális része hasonló a MYPT1/2 azonos szakaszaihoz, a MYPT3-ban öt ankirin-szerű ismétlődést és KHVLF szekvenciájú PP1c-kötő motívumot írtak le. Más MYPT izoformákkal ellentétben nem tartalmaz szabályozó foszforilációs helyet, de a fehérjében ATP/GTP kötőhely, SH3 motívum, valamint a C-terminálison prenilációs motívum (Skinner és Slatiel, 2001) is található. A MYPT3 általánosan expresszáldik, de nagyobb mennyiségben a szívben, agyban és vesében fordul elő.

A TIMAP fehérje (transzformáló növekedési faktor- β -által gátolt membránnal asszociált fehérje) szerkezetében hasonló a MYPT3-hoz (44,7 % szekvencia-homológia), 567 aminosavból áll és 64 kDa molekulatömegű fehérje. A fehérje expresszióját kimutatták az endotéliumban és hemopoetikus sejtekben is. A fehérje N-terminális részén a KVSF PP1c-kötő motívum és ankirin-szerű ismétlődések mellett sejtmagi lokalizációs szignál, míg a C-terminálison CAAX box található. A MYPT3-hoz hasonlóan ez a fehérje is prenilálható, így a plazmamembránban lokalizálódhat (Cao és mtsai., 2002). Pontos funkciója még nem ismert, de a TIMAP transzkripció repressziója TGF- β 1 által fontos tényezője lehet az endotéliális sejtek apoptotikus és/vagy kapilláris morfogenezis válaszának.

A MIOZIN FOSZFATÁZ SZABÁLYOZÁSA

A miozin foszfatáz szabályozása mind gátlás, mind aktiválás által megvalósulhat. A miozin foszfatáz gátlása jobban körülírt, létrejöhet a MYPT1 foszforilációja, a miozin foszfatáz holoenzim disszociációja, a holoenzim lokalizációjának változása és a miozin foszfatáz inhibitor fehérjékkel történő gátlása által. Aktiválásának molekuláris mechanizmusa még kevésbé jellemzett, de ismert, hogy ez a ciklikus nukleotidok koncentrációjának növekedésével állhat kapcsolatban.

A miozin foszfatáz gátlása a MYPT1 foszforilációjával

A miozin foszfatáz gátlásának lehetséges útvonalaiiban sokféle agonista játszhat szerepet, és általában G-fehérjéhez kötött receptorokon keresztül valósulhat meg. A kis molekulatömegű G fehérje, a RhoA, és a ROK fontos elemei a szabályozó folyamatnak (Somlyó és Somlyó, 2003). A zúza MYPT1 fehérjében két fő foszforilációs hely a Thr695 és Thr850 (a humán MYPT1-ben ezeknek a Thr 696 és Thr853 felel meg) található, amelyeket a ROK foszforilál (Feng és mtsai., 1999b).

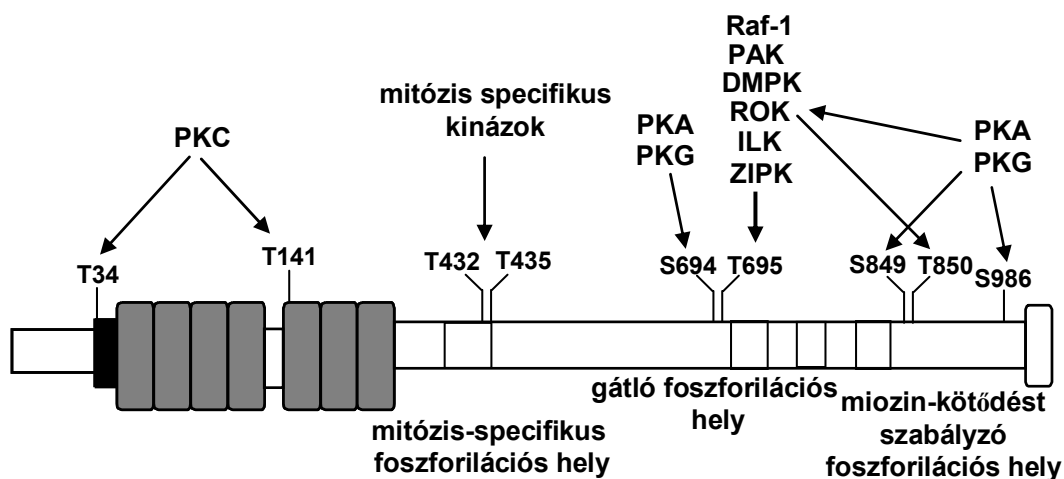
A 52-54 kDa ZIP kinázt (leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz) az apoptotikus folyamatokat kísérő alakváltozásokban szerepet játszó fehérjeként azonosították (Kawai és mtsai., 1998), amely a MLC20 foszforilációjával elősegíti a Ca^{2+} -tól független kontrakció kialakulását (Niiró és mtsai., 2001). A ZIP kináz 32 kDa formáját a miozin foszfatázzal asszociálódó enzimként írták le, amely a MYPT1 alegységet a gátló foszforilációs helyen foszforilálva csökkenti a miozin foszfatáz aktivitását. Ezzel a ROK-hoz hasonlóan a Ca^{2+} -érzékenyítési folyamat kialakulásában játszik szerepet (MacDonald és mtsai., 2001a).

Az ILK (integrinekhez kapcsolódó kináz) szintén gátolhatja a miozin foszfatáz aktivitást azáltal, hogy a gátló foszforilációs helyen foszforilálja a MYPT1-et (Kiss és mtsai., 2002; Murányi és mtsai., 2002). A ROK, ZIPK és az ILK a miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása mellett szintén foszforilálja a MLC20-at a Ser19 és a Thr18 foszforilációs helyeken, így részt vesz a Ca^{2+} -tól független kontrakció indukálásában. A MDPK (Murányi és mtsai., 2001) és a p21-aktivált protein kináz (PAK) (Takizawa és mtsai., 2002a), amelyeket a Rho család tagjai (cdc42 és Rac) szabályoznak, valamint a Raf-1 kináz (Broustas és mtsai., 2002) szintén képes a MYPT1 gátló foszforilációs helyét foszforilálni.

Jelenleg még nem tisztázott az a molekuláris mechanizmus, amellyel a MYPT1 gátló helyének foszforilációja hatással van a miozin foszfatáz aktivitására. Az egyik feltételezés szerint a MYPT1 foszforilált Thr695-öt tartalmazó peptidszakasza a PP1c aktív centrumának közelében kötődve gátolja a szubsztrát defoszforilációját.

A miozin foszfatáz aktiválása

A cAMP, cGMP vagy PKA és PKG katalitikus alegységei az összehúzódó permeabilizált simaizmot relaxálják állandó Ca^{2+} koncentráció mellett. A ciklikus nukleotidok, illetve az általuk aktivált kinázok feltételezhetően a miozin foszfatáz aktivitását növelik



4. ábra A MYPT1 alegység szabályozása

(Wu és mtsai., 1996). A MYPT1 foszforilációja akár PKA-val, vagy PKG-val, önmagában nem okoz változást a miozin foszfataz aktivitásban. A PKA és PKG a MYPT1 C-terminális szakaszát foszforilálja (Ser694/Ser849/986) (Nakamura és mtsai., 1999), és ez ugyan nem befolyásolja a miozin foszfataz aktivitását, de gyengíti a MYPT1 és a hozzá kötődő foszfolipidek kölcsönhatását. Így a PKA/PKG foszforiláció a miozin foszfataz aktivitás relatív növekedését okozza, mivel a foszfolipidek gátolják a miozin foszfataz aktivitást. A másik lehetséges szabályozási útvonal a PKA/PKG enzimek RhoA/ROK útvonal általi gátlása, mivel mindkét kináz képes a RhoA-t a Ser-188 oldalláncán foszforilálni és ezzel az aktív GTP-RhoA kialakulását gátolni (Murthy és mtsai., 2003). A cGMP szint növekedés hatására kialakuló relaxációt kiválthatja a PKGI α is. A PKGI α leucin cipzár motívumán keresztül kapcsolódik a MYPT1 leucin cipzárjához. A szövetek különböző MYPT1 izoformákat expresszálnak, és ezek nem mindegyike tartalmaz leucin cipzárt, ezért a szövetek (pl. fázisos típusú zúza vagy tónusos aorta simaizmok) cGMP érzékenysége eltérő. A PKGI α csak olyan szövetben képes a miozin foszfataz aktivitásának növelésére, amely szövet a leucin cipzár motívumot tartalmazó MYPT1 izoformát expresszálja (pl. aorta) (Khatrri és mtsai., 2001).

A PKA és PKG a Ser695 foszforilációjával is szabályozhatja a miozin foszfataz aktivitást. Ileum (csípőbél) simaizomban a 8-bromo-cGMP hatására a Ser694 foszforilációja

háromszorosára nőtt, és ez a foszforiláció megakadályozta a Thr695 foszforilációját ZIPK-zal vagy ROK-kal, csökkentve ezzel az enzim gátolhatóságát (Wooldridge és mtsai., 2004)

A miozin foszfatáz aktiválása létrejöhet a MYPT1 szubsztrát iránti megnövekedett affinitásával, például a sejtosztódás során. A MYPT1 savas régiójában lévő Ser427/430 (a humán MYPT1-ben Thr435/Ser432) oldalláncokat a mitózis során aktiválódó kinázok foszforilálják. A foszforilációs folyamatok során a MYPT1 affinitása megnő a foszforilált miozinhoz, amely a miozin fokozott defoszforilációjában nyilvánul meg, elősegítve ezzel a stresszrostok felbomlását a profázis előtt (Totsukawa és mtsai., 1999).

A PKC a MYPT1-et a kötőmotívum előtti Thr34 oldalláncon foszforilálja, de ennek a foszforilációnak más PP1c szabályozó alegységek PP1c-kötő motívuma körüli foszforilációjával ellentétben (G_M , NIPP) nincs hatása a miozin foszfatáz alegységek kölcsönhatására, ill. az enzim aktivitására (Tóth és mtsai., 2000b). Ha a PKC az ankirin-szerű ismétlődéseket tartalmazó régiót is foszforilálja, akkor csökken a MYPT1 miozinhoz és PP1c-hez való kötődése.

Az inhibitor fehérjék szabályozó szerepe (CPI-17, PHI-1, PHI-2, KEPI)

A CPI-17 fehérje foszforilációs állapotától függően gátolja a miozin foszfatázt (Eto és mtsai., 1995). A simaizomban és agyban expresszálódik. A CPI-17, más PP1 inhibitorokkal ellentétben (pl. I-1) nemcsak a PP1c katalitikus alegységét, hanem a miozin foszfatáz holoenzim aktivitását is képes gátolni. A CPI-17 foszforilációja a Thr38 oldalláncon PKC-val mintegy ezerszeresére növeli foszfatázgátló képességét. A miozin foszfatázhoz való kötődésében a CPI-17 középső doménja játszik szerepet, a miozin foszfatáz defoszforiláló hatásától az itt található Tyr41 oldallánc védi meg (Hayashi és mtsai., 2001). Számos kináz foszforilálhatja *in vitro* a CPI-17 Thr38 oldallancát, így például a ROK (Koyama és mtsai., 2000), a PKN (protein kináz N) (Hamaguchi és mtsai., 2000), a 32 kDa ZIPK (MacDonald és mtsai., 2001b), az ILK (Deng és mtsai., 2002), a PAK (Takizawa és mtsai., 2002a), a PKA (Dubois és mtsai., 2003) és PKG (Erdődi és mtsai., 2003). Artériás simaizomban hisztamin hatására a CPI-17 foszforilációja a Thr38 oldalláncon nő, ezt a foszforilációt a ROK és PKC inhibitorok gátolták (Kitazawa és mtsai., 2000).

A CPI-17-hez hasonló, foszforiláció-függő PP1 inhibitor fehérjék nem-izom sejtekben is előfordulnak. Ezek közül a PHI-1 (foszfatáz holoenzim inhibitor-1) a legtöbb sejttypusban expresszálódik (Eto és mtsai., 1999), míg a PHI-2 és KEPI (kináz által aktivált PP1 inhibitor) (Liu és mtsai., 2002) nagy koncentrációban a szívizomban található. A CPI-17 P-Thr38 oldallancát a PP2A és PP2C protein foszfatázok defoszforilálják (Takizawa és mtsai., 2002b),

így feltételezhető a miozin foszforiláció szabályozásának egyik lehetséges mechanizmusaként a miozin foszfatáz aktivitást szabályozó foszfofehérjék protein foszfatázok (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) általi defoszforilációja is.

A MYPT1 alegység disszociációjának és lokalizációjának szabályozó hatása

Permeabilizált simaizomban állandó Ca^{2+} koncentráció mellett az arachidonsav növeli a MLC20 foszforilációját és csökkenti a miozin foszfatáz aktivitását (Gong és mtsai., 1992). Ez utóbbi hatás feltételezések szerint a miozin foszfatáz holoenzim arachidonsav általi disszociációjának tulajdonítható. A MYPT1-PP1c δ komplex erősebben köti a foszforilált miozin szubsztrátot, mint a PP1c δ önmagában, így a holoenzim disszociációja a miozin foszfatáz aktivitás csökkenésében nyilvánul meg. Egy alternatív szabályozási útvonal lehet a ROK aktiválása arachidonsavval (RhoA-tól függetlenül), és ezt követően a miozin foszfatáz vagy a CPI-17 foszforilációja (Araki és mtsai., 2001).

A MYPT1 szubsztrát(ok)hoz irányító szerepének megváltozása szintén fontos szabályozó tényező lehet. A MYPT1 Thr850 oldalláncon történő foszforilációja csökkent miozin kötődést eredményez (Velasco és mtsai., 2002). Mivel a Thr850 foszforilációs szintje a ROK aktivitásától függ, ez a mechanizmus is a ROK által kiváltott miozin foszfatáz gátlásnak tekinthető.

Portális véna simaizmon végzett kísérletek alapján prosztaglandin F2 α (PGF2 α) hatására a citoszolikus miozin foszfatáz a plazmamembránhoz transzlokálódik, és ezzel párhuzamosan kimutatható megnövekedett foszforilációja a Thr695 oldalláncon. A foszforilációt követően a holoenzim disszociál és a PP1c a citoszolba diffundál (Shin és mtsai., 2002).

CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintésből kitűnik, hogy a miozin foszforiláció és ebben a miozin foszfatáz szerepét széleskörűen tanulmányozták izomszövetekben, ahol jelentőségét az izomkontrakció szabályozásában és a miozinhoz kötött más citoszkeletális változásokban mutatták ki. A miozin foszfatáz a miozin mellett más, az aktinhoz és egyéb filamentumokhoz kötődő fehérjéket (adducin, moezin, Tau, MAP-2) is képes defoszforilálni, amely azt sejteti, hogy az enzim, viszonylag specifikusnak tűnő neve ellenére, a kontraktilitás mellett más sejtfolyamatok szabályozásában is részt vehet. Ezt megerősítik azok az adatok is, amelyek

szerint a MYPT1 izoforma minden eddig vizsgált eukarióta sejtben jelen van, sejtben belüli lokalizációja viszont (az eddigi viszonylag szűk körű vizsgálatok szerint) nem csak a miozint tartalmazó szubcelluláris kompartmentekre korlátozódik.

Munkahipotézisünk szerint a miozin foszfatáz további fiziológiai szerepének megismerését segítheti az enzim lokalizációjának feltárása különböző típusú és eltérő funkciót ellátó nem-izom sejtekben. Ezzel párhuzamosan az enzim szerepének és szabályozásának megértéséhez hozzájárulhat új kölcsönható fehérjék kimutatása és azonosítása is. A miozin foszfatáz MYPT alegysége számos oldalláncon foszforilálódik, ezeket a foszforilációs folyamatokat számos protein kináz katalizálhatja *in vitro*. Keveset tudunk azonban az *in vivo* szerepet játszó kinázokról, valamint a különböző foszforilációs helyeknek és az enzim (valamint a MYPT1) lokalizációjának kapcsolatáról. Érdekes, és eddig még nem tanulmányozták, hogy a PP2A, amelyet *in vitro* MYPT1 foszfatázként valószínűsítettek, vajon szerepet játszik-e a sejtekben a MYPT1 defoszforilációjában.

A felvetett kérdések alapján a kísérletes munka fő célkitűzéseit az alábbiak voltak.

1. A miozin foszfatáz és a MYPT1 lokalizációjának tanulmányozása agyszövetben és primer neuronokban:

- régióspecifikus és szubcelluláris megoszlás vizsgálata miozin foszfatáz aktivitás meghatározásával, immunoblottal és immunfluoreszcenciával
- MYPT1-gyel kölcsönható neuronális fehérjék kimutatása és azonosítása immunprecipitációval és specifikus kölcsönhatásokon alapuló (pull-down) módszerrel.

2. Foszfatázgátló okadainsavval indukált MYPT1 és a miozin foszforiláció, valamint sejtmotilitás változás tanulmányozása HepG2 sejtekben:

- a MYPT1 és miozin foszforiláció, valamint a PP2A aktivitás változás kapcsolatának vizsgálata
- a defoszforilált MYPT1 és az eltérő helyeken foszforilált MYPT1 lokalizációs sajátosságainak feltárása
- az okadainsav hatásának tanulmányozása a stresszrostok képződésére és a HepG2 sejtek migrációjára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásból: [γ - ^{32}P]ATP (IZINTA), CNBr-aktivált Sepharose 4B, Protein-A Sepharose, Glutation-Sepharose, nagy érzékenységgű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagens, nitrocellulóz membrán (0,45 μm pórusméret); (Amersham Bioscience); Teljes Mini Proteáz Inhibitor Koktél tabletták, 5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát (BCIP), nitroblue-tetrazolium klorid (NBT) (Roche); bikinkoniniksav (BCA) Fehérjemérési Reagens Kit (Pierce); Antifade Light Kit, propídium-jodid, Alexa 633-konjugált falloidin (Molecular Probes); Avidin-konjugált FITC (Boehringer Mannheim); penicillin/streptomycin oldat, hepatocita növekedési faktor (HGF), tripszin, okadainsav (SIGMA); Y27632 inhibitor (Calbiochem); idegi növekedési faktor (NGF) (Upstate Biotechnology); Kaleidoscope fehérje molekulatömeg standard, 10-12 % poliakrilamid előöntött gél (Bio Rad); MEM (minimum esszenciális tápoldat), D-MEM (Dulbecco's MEM), borjúsérum (FBS), antibiotikum-antimikotikum oldat, L-glutamin oldat (Gibco Brl.); Plazmid MiniPrep izoláló Kit, Ni-NTA Superflow resin, M15 baktérium vonal (Qiagen). Kvantitatív Sejtmigrációs Kit (Chemicon). Minden más vegyszer a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb tisztaságú volt (SIGMA, Reanal).

Állatkísérletek

A kísérleteket laboratóriumi körülmények között tartott Wistar patkányokon végeztük. Valamennyi állatkísérlet megfelelt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága, az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács és a Hajdú-Bihar megyei Állategészségügyi – és Élelmiszer Ellenőrző Állomás szabványainak, valamint az Európai Közösség Bizottsága elvárásainak és az NIH állatkísérletekkel kapcsolatos útmutatásainak.

Antitestek

Az antitesteket a feltüntetett irodalmi hivatkozásokban leírtak szerint alkalmaztuk vagy kereskedelmi forgalomban szereztük be, és a gyártók útmutatásai szerint jártunk el.: anti-MYPT1¹⁻³⁸ és anti-MYPT1⁶⁸⁹⁻⁷⁰² (Wu és mtsai., 2003); anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (Lontay és mtsai., 2004), anti-PP2Ac, anti-MYPT^{pT695}, anti-MYPT^{pT850} (Upstate); anti-szinaptofizin (BioGenex); anti-MLC20 (Abcam), anti-MLC20^{pS19} (Cell Signalling); anti-ROK (Feng és mtsai., 1999a); anti-PP1c δ (Shimuzu és mtsai., 1994); anti-PP1 (E9) (Santa Cruz Biotech.); anti-ZIPK (Calbiochem), tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl IgG, HRP-konjugált

anti-egér IgG, alkalikus foszfatáz (AP)-konjugált anti-nyúl IgG (SIGMA), Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG és Alexa 633-konjugált anti-egér IgG (Molecular Probes) és biotin-konjugált anti-nyúl IgG (Vector).

Baktériumban expresszált és affinitás kromatográfiával tisztított His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ peptidet használtuk antigénként a poliklonális anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest előállításához (Harlow and Lane, 1988). Tisztított His-MYPT¹⁻²⁹⁶ peptiddel nyulakat immunizáltunk, kéthetes időközönként a peptidet 150 µg-os mennyiségben bőr alá injektálva. Az immunizálási periódus végén a nyulat mélyenaltattuk, majd elvéreztettük. A vért két órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 4 °C-on éjszakán át állni hagytuk a legjobb hatásfokú véralvadás elérése érdekében. Ezt követően 4 °C-on centrifugáltuk (10000 g 10 perc) és az antitestet a fennmaradó szérumból affinitás kromatográfiával tisztítottuk His-MYPT1¹⁻²⁹⁶-Sepharese oszlopon.

Fehérjék és peptidek

Pulyka zúzából származó miozin (Wu és mtsai., 2003) és izolált 20 kDa könnyűlánc foszforilációjával (Erdődi és mtsai., 1995) foszfoszubsztrátokat állítottunk elő. Az N-terminális MYPT¹⁻²⁹⁶ peptid a csirke zúzából klónozott 130 kDa MYPT1 izoforma szekvenciáján alapult (Shimuzu és mtsai., 1994), amelyet M15 *E. coli* sejtvonalon expresszáltuk hexahisztidin-fúziós fehérjeként (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶) és a bakteriális lizátumból Ni-NTA Superflow oszlopon tisztítottuk (Tóth és mtsai., 2000a). A PP1cδ izoformát szintén hexahisztidin-tag-gel ellátott fehérjeként (rPP1cδ) expresszáltuk M15 *E. coli* sejtvonalon (Tóth és mtsai., 2000b) és a PP1c-t nyúl vázizomból tisztítottuk affinitás kromatográfiával Ni-NTA Superflow oszlopon (Tóth és mtsai., 2000b). A csirke zúza 133 kDa MYPT1 izoformát (amely a 130 kDa MYPT1 izoformától a központi inzert (512-552 aminosavak) meglétében tér el) glutation-S-transzferáz fúziós fehérjeként (GST-MYPT) expresszáltuk és Glutation-Sepharese felhasználásával tisztítottuk (Feng és mtsai., 1999b).

Patkány agyrégiók lizátumának preparálása Western blot analízishez

Wistar hím patkányokat intraperitoniálisan, 5 mg/testsúly kg dózisban adott Trapanallal (nátrium tiopentobarbitál) altattunk, majd lefejeztünk. A patkány agyból a következő agyrégiókat különítettük el: *bulbus olfactorius*, agykéreg; *striatum*, *hippocampus*, köztiagy; középagy, utóagy és kisagy. Az eltávolított szövetet jéghideg foszfát pufferben (PBS: 8,06 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137,9 mM NaCl, (pH 7,4)) mostuk, majd lemértük. Valamennyi preparált agyrégióhoz 1 ml jéghideg homogenizáló

puffert (20 mM HEPES (pH 7,5), 0,25 M szacharóz, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA és proteáz inhibitor koktél (1:10 hígításban)) adtunk. A szövetdarabokat jégen tartva Dounce homogenizátorral homogenizáltuk, majd 10 percig (0,1 % Triton X-100 hozzáadása után) jégen tartottuk. A homogenizátumokat vortexen kevertettük és ultrahangosan feltártuk (3x 20 pulzus/perc intenzitás). Mindegyik agyrégióból készített lizátumból 50 µg fehérjét vittünk fel SDS-PAGE-ra (nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis).

Primer hippocampus és nucleus cochlearis sejt kultúra preparálása

A *hippocampus* és a *nucleus cochlearis* sejtek preparálásához a megfelelő agyrégiókat háromnapos Wistar patkányokból távolítottuk el, és azokat jéghideg preparáló oldatba (10 mM HEPES (pH 7,4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0,2 mM KH₂PO₄, 20 mM szacharóz, 15 mM glükóz, 12 U/ml penicillin és 10 µg/ml streptomycin) merítettük. A sejtek diszperzióját követően a sejtek proteolízisét 0,25 % tripszint is tartalmazó oldattal végeztük (37 °C 30 perc). Az emésztett patkány agyrészeket 10 % FBS-t tartalmazó minimum esszenciális médiumban (MEM) trituráltuk. Ezt követően 10 % FCS, 0,1 µg/ml NGF, 12 U/ml penicillin és 10 µg/ml streptomycin tartalmú MEM-et tartalmazó a sejt kultúra edénybe helyeztük, amelyet 37 °C-on 5 % CO₂ és 95 % levegő, valamint 85% páratartalom mellett tenyésztettünk.

Szinaptoszóma és poszt-szinaptikus denzitás frakciók izolálása patkány kisagykéregből

A szinaptoszóma és poszt-szinaptikus denzitás frakció izolálását az irodalomban leírt módszer szerint (Carlin és mtsai., 1980) végeztük az alábbi módosításokkal. A kiindulási agykéreg nedves térfogata 4 g volt. A szinaptoszómát és mitokondriumot tartalmazó homogenizátumot szacharóz grádiens (0,8 M, 1,0 M és 1,2 M szacharóz) centrifugálással választottuk el (Beckman Type 35 rotor, 2 óra, 83000 g). A szinaptoszóma frakciót az 1 M és 1,2 M szacharóz közötti sávból műanyag pipettaheggyel távolítottuk el, az átlagos hozam 1 ml volt (0,3 mg/ml fehérje koncentráció). 500 µl szinaptoszóma frakciót használtunk fel a poszt-szinaptikus denzitás további izolálásához szacharóz grádiens (0,8 M, 1,5 és 2,0 M szacharóz) centrifugálással (Beckman SW-41 rotor, 2 óra, 202300 g). A poszt-szinaptikus denzitás frakciót 1,5 és 2 M szacharóz közötti sávban kaptuk, átlagos hozama 0,4 ml volt (0,1 mg/ml fehérje koncentráció). A szinaptoszóma és a poszt-szinaptikus denzitás frakciók miozin foszfatáz aktivitását 30-szoros véghígításban mértük. A frakciókban lévő MYPT1, ROK,

szinaptofizin és PP1c δ azonosításához 15 μ g szinaptoszóma és 5 μ g posztszinaptikus denzitás fehérjét analizáltunk Western blottal.

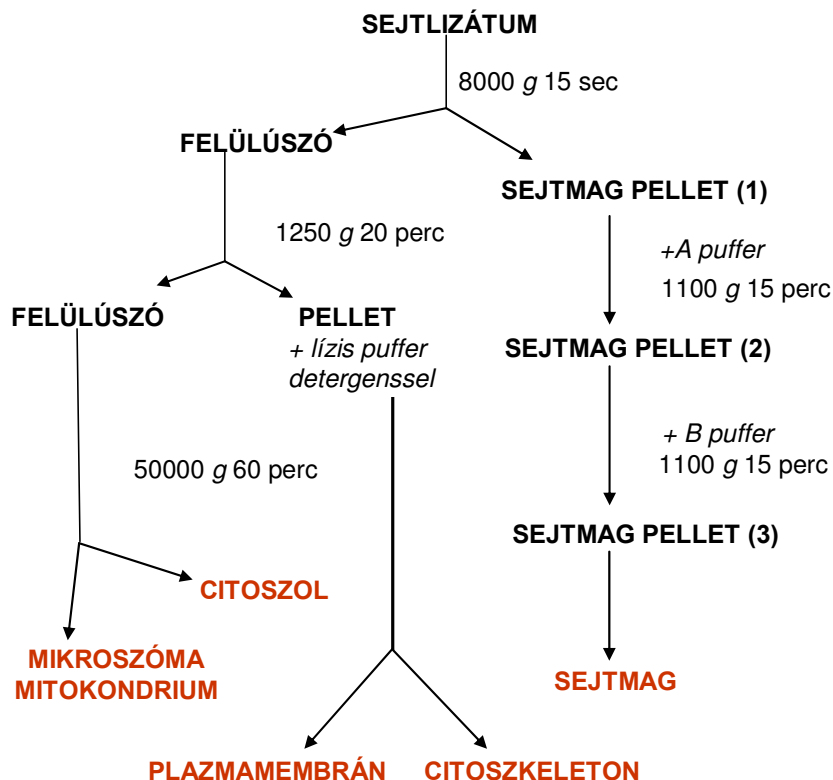
HepG2 sejt kultúra és a sejtek kezelése inhibitorokkal

A kísérletekhez a European Collection of Cell Cultures (ECACC) cégtől származó humán hepatokarcinóma (HepG2) sejteket használtunk. A HepG2 sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5 % CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében történt. A sejtek fenntartása D-MEM oldatban történt, amely 10 % FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillin/streptomycin-t és 500 U/ml antibiotikum-antimikotikumot tartalmazott.

Az inhibitorokkal történő kezeléshez 85 %-os konfluenciáig növesztettük a sejteket, amelyeket a kezelés előtt 12 órán át 0,1% FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin oldatot és 500 U/ml antibiotikum-antimikotikum oldatot tartalmazó D-MEM-ben inkubáltunk a sejtek szinkronizálásához és éheztetéséhez. A HepG2 sejteket 5-50 nM OA vagy 10 μ M Y27632 inhibitorral, vagy a két anyag kombinációjával inkubáltuk 60 percig. A kezelést követően a sejteket először jéghideg PBS-sel mostuk, majd proteázgátlókat is tartalmazó RIPA puffer (1% (v/v) Nonidet P-40, 1% (w/v) nátrium deoxikolat, 0,1% (w/v) SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M nátrium-foszfát (pH 7,2), 2 mM EDTA, 50 mM nátrium-fluorid) hozzáadásával (10 μ l/cm² sejtenyésző edény) sejtkaparó segítségével felvettük, lizáltuk és jégen tartva ultrahangos kezelésnek vetettünk alá. A teljes sejtlizátumot használtuk fel Western blot analízishez.

HepG2 sejtek szubcelluláris frakcióinak preparálása

A sejtmag (Roberts és mtsai., 1998), citoplazma, mikroszóma/mitokondrium, citoszkeleton és plazmamembrán frakciók (Phung és mtsai., 1997, Diaz-Guerra és mtsai., 1991) izolálása korábban közölt módszerek alapján történt kisebb módosításokkal (4. ábra). A HepG2 sejteket 80 %-os konfluenciáig növesztettük, majd kétszer PBS-sel mostuk. A sejteket PBS-ben óvatosan felvettük, majd centrifugáltuk (100 g, 4 °C, 5 perc). Négyszeres térfogatú homogenizáló pufferral (0,25 M szacharóz, 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, proteázgátló koktél) Dounce homogenizátor segítségével homogenizáltuk, majd 0,5% Nonidet P-40-et adtunk hozzá. A sejtlizátumot 10 másodpercig óvatosan vortexszel kevertük. A lizálás hatásfokát tripán kék festékekkel történő festéssel ellenőriztük. A lizátumot centrifugáltuk (8000 g, 4 °C, 15 másodperc). Az így kapott üledék sejtmagot és sejttörmeléket tartalmazott. A pelletet háromszoros térfogatú A pufferben (0,25 M szacharóz,



5. ábra. Szubcelluláris frakciók izolálása HepG2 sejtekből.

10 mM (pH 7,9), 3,3 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0,5 mM DTT és proteázgátlók) szuszpendáltuk és centrifugáltuk (2000 g, 15 perc, 4 °C). A felülúszót eltávolítva a pelletet 2,5 térfogatnyi B pufferben (a puffer összetétele ugyanaz, mint az A pufferé azzal az eltéréssel, hogy ez 0,35 M szacharózt tartalmazott) újra szuszpendáltuk. A szuszpenziót centrifugáltuk (1100 g, 15 perc, 4 °C), és az így nyert pelletet B pufferben vettük fel, majd ultrahangos kezelésnek (10 pulzussal, 15 másodperces intervallum) vetettük alá. A feltárás során kapott szuszpenzió a *sejtmag frakció*. A 8000 g centrifugálással kapott felülúszót ismét centrifugáltuk (1250 g, 20 perc, 4 °C), és az így kapott felülúszót tovább centrifugáltuk (Bechman Type 65 rotor, 50000 g, 60 perc, 4 °C). Az ultracentrifugálás során kapott pellet megfelel a *mikroszóma/mitokondrium frakciónak*, a felülúszó pedig *citoszol frakciónak*. Az 1250 x g centrifugálás pelletét 1% Nonidet P-40-et tartalmazó homogenizáló pufferben szuszpendáltuk, majd vortexszel történő 5 perces kevertetés után a szuszpenziót tovább centrifugáltuk (50000 g, 60 perc, 4 °C); a felülúszó a *plazmamembrán frakciónak* felel meg. A pelletet, amely a citoszkeleton frakciónak felel meg, a későbbi kísérleti felhasználásától függően kétszeres térfogatú RIPA pufferben inkubáltuk 5 percig 4 °C-on Western blot analízishez, vagy 0,5% Nonidet P-40-et tartalmazó homogenizáló pufferben tártuk fel (15x5 impulzus) protein foszfatáz aktivitásméréshez.

Western blot

Az agyrégiókból és HepG2 sejtekből készített lizátumok, valamint az izolált HepG2 szubcelluláris frakciók, szinaptoszóma és posztszinaptikus denzitás frakciók fehérje koncentrációinak meghatározásához BCA reagenst használtunk, amelyhez a lizátumokat 1:10 arányban hígítottuk. Standardként BSA-t (marha szérumból albumin) használtunk, az oldatok abszorbanciáját 540 nm-en ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével detektáltuk. A fehérjekoncentráció (mg/ml) meghatározásához az abszorbancia adatokat GraphPad Prism software-rel analizáltuk lineáris regressziót alkalmazva. A fehérjemintákat a lizátumok esetén RIPA pufferben, a szubcelluláris frakciók esetén pedig homogenizáló pufferban hígítottuk, majd 5xSDS minta puffert adva hozzá 100 °C-on 5 percig inkubáltuk.

A fehérjéket SDS-PAGE választottuk el Laemmli (1970) módszerét alkalmazva 10 vagy 12 % akrilamidot tartalmazó gélen Bio-Rad MiniProtean készüléket használva. Foszfospecifikus antitestekkel (anti-MYPT^{pT695}, anti-MYPT^{pT850} és anti-MLC20^{pS19} antitestek) analizált blottokhoz a géltre 70 µg fehérjét vittünk fel. 50 µg összefehérje mennyiség került felvitelre SDS-PAGE-ra az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶, anti-MYPT¹⁻³⁸, anti-MLC20, anti-ROK, anti-PP1 α és anti-PP1 (E9) antitestek használata esetén. A géleket nitrocellulóz membránra blottoltuk BioRad transzfer egységgel 100 V-on 90 percig BioRad hűtőegység alkalmazásával (Murányi és mtsai., 1998). A membrán blokkolásához 5 % zsírszegény tejport, 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-t használtunk, az első illetve második antitest hígításához pedig 0,1 %-os tejpor/PBS/ Tween oldatot. A blokkolást követően a membránokat mostuk, majd elsődleges antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten 90 percig vagy 4 °C-on éjszakán át. Ezt követte HRP-konjugált másodlagos antitesttel történő inkubálás szobahőmérsékleten 60 percig. Az immunreakciókat nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló oldattal (ECL) detektáltuk. A foszforilációs helyre specifikus antitestek esetén a PBS puffer helyett minden esetben TBS puffert (amelyében a foszfátot 25 mM Tris-HCl helyettesítette) használtunk.

A különböző agyrégiók relatív MYPT1 mennyiségének meghatározásához szemi-quantitatív Western blot analízist végeztünk, amelyhez standardként His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ peptidet használtunk 1-1000 ng mennyiségben. A blottokat denzitometráltuk és az ábrákat a Molecular Analyst Szoftver (BioRad) Volume Analyse mellékprogramjával elemeztük. A MYPT1 sávok denzitását az agykéreg lizátumok esetén minden egyes blottra külön elemeztük és az agykéreg értékét tekintettük 100 %-nak. A többi agyrégió lizátumának denzitometriás értékeit az agykéreghez viszonyítva százalékos arányban adtuk meg. Az agykéreg mintákban, az 50 µg összefehérjében lévő MYPT1 koncentrációjának

meghatározásához az agykéreg lizátumot immunoblottal vizsgáltuk mind az anti-MYPT1¹⁻³⁸, mind az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestekkel. A blotok intenzitását ugyanazon a gélen futtatott His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ standardokhoz viszonyítottuk.

Protein foszfatáz aktivitásmérés

A patkány agyrégiók lizátumát, a szinaptoszóma és posztszinaptikus denzitás frakciókat, illetve a HepG2 sejtek szubcelluláris frakcióit 0,1 % BSA-t és 0,1 % 2-merkaptoetanolt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferrel hígítottuk. A protein foszfatáz aktivitás meghatározásához 30 °C-on szubsztrátként 2 μ M ³²P-miozint (Wu és mtsai., 2003) vagy 2 μ M ³²P-MLC20-at (Erdődi és mtsai., 1995) használtunk. A foszfatáz aktivitás egysége az a fehérjemennyiség, amely a szubsztrátból 1 μ mol foszfátot (P_i) szabadít fel egy perc alatt.

A teljes HepG2 sejtlizátumot egyszeres térfogatnyi, proteázgátlókat is tartalmazó homogenizáló pufferrel lizáltuk, majd 25 pulzussal szonikáltuk jégen a protein foszfatáz aktivitásmérést megelőzően. A lizátumot 5, 50, 100, 500 és 1000 nM végkoncentrációjú okadainsavval inkubáltuk 2 percig, majd a foszfatáz aktivitást 0,5 μ M ³²P-miozin vagy 0,5 μ M ³²P-MLC20 szubsztráttal mértük 30 °C-on 0,5-1 perc reakcióidővel.

Immunhisztokémia

Hím Wistar patkányokat (~200-250 g) transzkardiálisan 0,1 M Tris/ PBS (TBS, pH 7,4) és 25 % szacharózt tartalmazó oldattal 15 percig perfundáltunk. A teljes agyat eltávolítottuk, majd jégen a következő régiókra választottuk szét: *bulbus olfactorius*, előagy, középagy, kisagy és alsó agytörzs. Az agydarabokat szűrőpapíron szárítottuk és Tissue-Tek-be ágyazva gyorsfagyasztottuk folyékony nitrogen felett (~-80-120 °C). Kriosztáttal horizontális és szaggitális metszeteket (10 μ m) készítettünk. A szeleteket szilánnal borított fedőlemezekre helyeztük és szárítottuk, majd 1-4 % paraformaldehid (PFA)/TBS oldattal 1-10 percig vagy jéghideg acetonnal 5 percig fixáltuk. A metszeteket egy órán át 10 % normál lószérumot, 0,1 % BSA-t, 0,01 % NaN₃-ot, 0,3 % Triton-X 100-at (BSA/Triton X-100/PBS) tartalmazó PBS pufferral blokkoltuk, majd anti-MYPT1¹⁻³⁸ poliklonális antitesttel (1:100 BSA/Triton X-100/PBS pufferben hígítva) inkubáltuk 48 óráig 4°C-on. Ezt követően biotinnal-konjugált anti-nyúl IgG-vel (1:200 hígításban BSA/Triton X-100/PBS-ben) vagy AP-konjugált anti-nyúl IgG-vel (1:200) inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten. A detektáláshoz a metszeteket avidin-konjugált FITC-cel (1:2000) inkubáltuk 30 percig

szobahőmérsékleten, vagy alkalikus foszfatáz reakciót alkalmaztunk, amelyhez a metszeteket 50 mg/ml BCIP, 100 mg/ml NBT, és 10 mM MgCl_2 -ot tartalmazó 0,2 M Tris/HCl (pH 9,5) pufferben inkubáltuk 5-10 percig sötétben a liláskék precipitátum kialakulásáig. Az antitestekkel történő inkubálások között a metszeteket négyszer 10 percig PBS-sel mostuk. Kontroll kísérleteket végeztünk az elsődleges antitest (anti-MYPT1¹⁻³⁸) nélkül vagy az elsődleges antitest preabszorpciójával a MYPT1¹⁻³⁸ (0,4 mg/ml) blokkoló peptiddel. A kontroll immunhisztokémiai vizsgálatok során nem tapasztaltunk detektálható festődést. A metszeteket az antitestek hígításához használt pufferrel, illetve PBS:glicerín 1:1 arányú keverékével fedtük le.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

Primer *hippocampus* és *nucleus cochleáris* sejteket a negyedik tenyésztési napon 70 %, 90 % és 100 % jéghideg etanollal fixáltunk 5-5 percig – 20 °C-on, majd PBS-sel mostuk. A sejteket 0,05 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel permeabilizáltunk 1 percig szobahőmérsékleten, majd háromszor mostuk PBS-sel. 2 mg/ml steril BSA-t tartalmazó PBS-sel blokkoltuk 1 óráig 4 °C-on. A fixált sejteket az elsődleges antitesttel (1:150 1 mg/ml BSA/PBS-sel) inkubáltuk 2-6 órán át. A fedőlemezeket PBS-sel háromszor 10 percig mostuk, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-vel és Alexa 633-konjugált anti-egér antitesttel (1:200) inkubáltuk 4 °C-on 90 percig. A mintákat háromszor 10 percig mostuk PBS-ben, majd 2xSSC oldatban (0,3 M nátrium klorid, 30 mM nátrium citrát (pH 7,0)) ekvilibráltuk. 1 mg/ml propídium jodidot 2xSSC oldatban 1:3000 arányban hígítottuk, amellyel a sejteket 1 percig inkubáltuk a sejtmag festéséhez. Végül a fedőlemezeket Antifade Light Kit segítségével fedtük le.

A HepG2 sejteket a kísérlet előtt 24 órával helyeztük a steril fedőlemezre (d=12 mm) 10 % FBS-t tartalmazó D-MEM-ben. Az inhibitorokkal történő kezelés előtt a sejteket 12 óráig szérummentes D-MEM-ben inkubáltuk. A HepG2 sejteket 5-50 nM okadainsavval, vagy 10 μM Y27632 vagy Y27632 és okadainsav jelenlétében inkubáltuk 0,1% FBS-t tartalmazó D-MEM-ben. Jéghideg PBS-sel kétszer mostuk, majd 70 %, 90 % és 100 %-os jéghideg etanollal 5-5 percig -20 °C-on vagy 4% PFA-val 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, amelyet ismét mosás követett PBS-sel. A sejteket 0,05 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel permeabilizáltunk 2 percig szobahőmérsékleten, majd háromszor mostuk PBS-sel. Blokkoláshoz steril, 2 mg/ml BSA-t tartalmazó PBS-t használtunk (1 óra, 4 °C). Az elsődleges antitesteket 1:200-1:500 arányban 1 mg/ml BSA/PBS-sel hígítottuk és a fedőlemezeket 6-12 órán át inkubáltuk nedveskamrában. Háromszori PBS-sel történő mosás

után Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-vel vagy Alexa 546-konjugált anti-egér IgG-vel inkubáltuk (1:500 hígítás) 90 percig 4 °C-on. Az F-aktin festéséhez Alexa 633-konjugált falloidint (1:500 hígítás 1 mg/ml BSA/PBS-ben) használtunk (60 perc, 4 °C). A mintákat háromszor 10 percig mostuk PBS-ben, majd 2xSSC oldatban ekvilibrálna a sejtmagot propídium jodiddal festettük. Végül a fedőlemezeket Antifade Light Kit segítségével fedtük le. Az immunofluoreszcenciás jelölést követően a primer neuronális sejteket és a HepG2 sejteket Hélium/Neon (543) és Kripton/Argon (488, 647) lézer detektorokkal felszerelt Zeiss LSM 410 konfokális lézer mikroszkóppal (Zeiss LSM 410; Carl Zeiss) vizsgáltuk 90-175 nm pinhole-t alkalmazva. Az agymetszeteket Zeiss AxioCam digitalis kamerához csatlakoztatott fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss AxioLab; Carl Zeiss) vizsgáltuk, és Plan-Apochromat 63x/1,4 nagyítású olaj DIC immerziós objektív lencsét alkalmaztunk. A sejtek optikai szeletelésével 0,8-1,2 µm rétegvastagságú felvételeket kaptunk. A digitalizált felvételeket LSM 5 Image Examiner (Carl Zeiss Microscope Systems) vagy AxioVision 3.1 szoftver program segítségével készítettük el, majd a Photoshop képkészítő szoftvert alkalmaztunk az ábrák készítéséhez (Adobe Systems).

Immunprecipitáció

Protein-A Sepharose-t inkubáltunk affinitás tisztított anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel immunoprecipitációs pufferben (IP puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,01 % SDS és proteázgátló koktél) 1-2 óráig 4 °C-on, majd 800 g 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A patkány agy *hippocampus*ból származó fehérjeextraktumot (100 µg fehérje) IP pufferben hígítottunk, majd előtisztítottuk (precleared) 10 µl Protein-A Sepharose-zal 1-2 órán át, és 800 g 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk. Az előtisztított agy kivonatot anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel-kötött Protein-A Sepharose-zal inkubáltuk 6 óráig 4 °C-on. A kontroll kísérletben az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitestet nem-immun nyúl immunoglobulinnal helyettesítettük. A Protein-A Sepharose szemcséket háromszor C pufferrel (20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 0,1 % SDS és proteázgátló koktél), háromszor D pufferrel (20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X 100, 0,1 % SDS és proteázgátló koktél) és háromszor PBS-sel mostuk. Valamennyi mosást követően a folyadékot maradéktalanul eltávolítottuk a szemcsékről. A Protein-A Sepharose-t SDS minta pufferral inkubáltuk 100 °C-on 5 percig, és a fehérjéket SDS-PAGE-val választottuk el. A PP1c izoformák kimutatása esetén az immunoblothoz 20 ng tisztított rekombináns PP1cδ-t és vázizomból tisztított PP1c-t használtunk. A géleket nitrocellulóz membránra traszferáltuk és a blot előhívásához a következő antitesteket használtuk: anti-

MYPT¹⁻²⁹⁶ (1:2000), anti-PP1c δ (1:1000), anti-PP1(E9) (1:500), anti-ROK (1:1000) és anti-szinaptofizin (1:1000) antitestek.

GST-MYPT pull-down assay

Glutation-Sepharose-t 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 proteáz inhibitorokat tartalmazó kötő pufferrel ekvilibráltunk, majd 400 μ l 0,1 μ M GST vagy 0,1 μ M GST-MYPT1-et kapcsoltunk 100-100 μ l Glutathione-Sepharose-hoz kötő pufferben. A Glutation-Sepharose által nem kötött GST-t vagy GST-MYPT1-et a kötő pufferrel történő mosásokkal (2x) távolítottuk el. A szinaptoszóma frakciót (30 μ g fehérje) Glutathione-Sepharose-zal előtisztítottuk, majd 100 μ l GST-vel (kontroll) vagy GST-MYPT1-gyel kapcsolt Glutathione-Sepharose-zal inkubáltuk 1 ml-es térfogatban 2 óráig 4 °C-on (lassú kevertetéssel). A gyantát háromszor mostuk kötő pufferrel, majd a gyanta által kötött fehérjéket SDS minta pufferrel történő forralással szolubilizáltuk. A mintákat anti-MYPT¹⁻²⁹⁶, anti-ROK, anti-szinaptofizin és anti-PP1c δ antitestekkel vizsgáltuk Western blot analízissel.

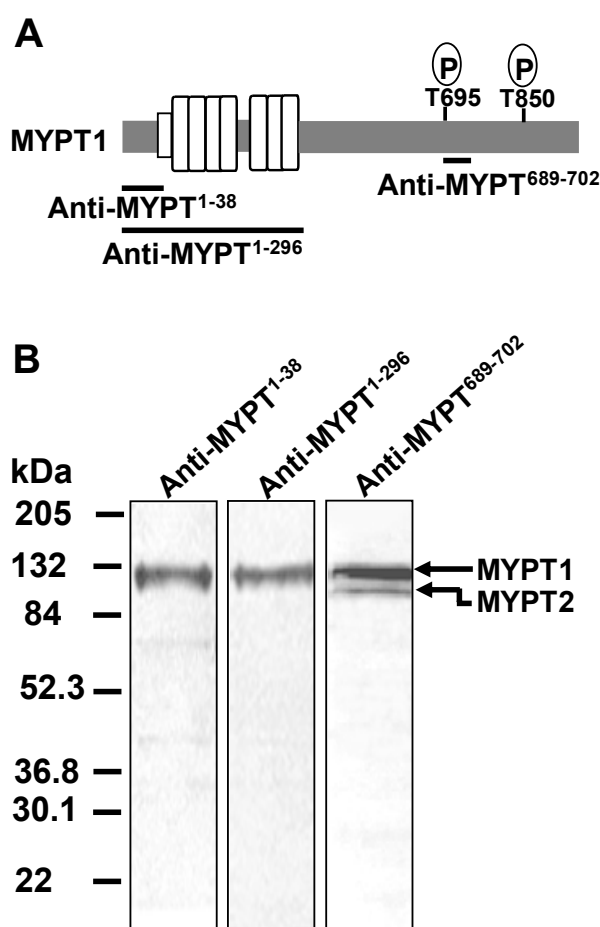
Sejtmigrációs vizsgálat

A sejtmigráció kvantitatív méréséhez fibronectinnel borított Quantitative Cell Migration Assay (Chemicon Int., ECM 500) kitet használtunk követve a gyártó leírását. A HepG2 sejteket 18 órával a passzálás előtt szérum-mentes D-MEM-ben éhezettünk. 2,5 x 10⁵ sejtet tettünk ki valamennyi fibronectinnel borított Boyden kamrába, és a letapadás kontrolljául szolgáló fibronectinnel borított 12 lyukú tenyésztőedény vályúiba is. A Boyden kamra felső osztatába helyezett sejteket 5, 50 nM OA és 10 μ M Y27632 vagy a két inhibitorral együtt inkubáltuk 18 óráig 0,5 % FBS-t tartalmazó DMEM médiumban. A kamra alsó osztatába kemoattraktánsként 50 ng/ml HGF-get és 0,5 % FBS-t tartalmazó D-MEM-et helyeztünk. A membránon keresztül migrált sejteket fixáltuk és festékekkel inkubáltuk, majd mostuk. A sejtekben akkumulálódott festéket extrakciós pufferrel nyertük ki, és a migráció mértékével arányos festékmennyiség abszorbanciáját 540 nm-en mértük. Az abszorbanciát a kontroll sejtekhez viszonyított százalékos értékekben adtuk meg, és Graph Pad Prism Software (Microsoft) segítségével ábrázoltuk. A kísérletben kontrollként szereplő fibronectinnel borított sejtenyésző edényben lévő sejtek száma a sejtek életképességét mutatja az inhibitorokkal történő kezelés hatására.

EREDMÉNYEK

A MYPT1 és MYPT2 izoformák kimutatása patkány agyban

A MYPT izoformáit, a MYPT1-et, és ezzel az izoformával 61 %-os szekvencia-hasonlóságot mutató MYPT2-t agyszövetben már kimutatták (Fujioka és mtsai, 1998). SDS-PAGE gélen a MYPT1 molekulatömege 131 kDa, míg a MYPT2 izoformáé 112 kDa. Az izoformák között jelentős eltérés az N-terminális régióban figyelhető meg, de a gátló foszforilációs hely körüli peptidszakasz (Thr695 a 133 kDa zúza MYPT1 izoforma és Thr646 a humán MYPT2 esetén) erősen konzervált. Az 6A. ábra a MYPT1 szerkezeti vázlatát mutat-



6.ábra A miozin foszfatáz szabályozó alegység (MYPT1) szerkezeti vázlata az antitestek termeltetéséhez használt peptidszakaszok jelölésével.

(A) A MYPT1 PP1c kötő motívumát tartalmazó 1-38 peptidszakasz ellen termeltetett poliklonális antitest (anti-MYPT¹⁻³⁸), az ankirin-szerű ismétlődést (40-296) is magába foglaló régió ellen termeltetett anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ ellenanyag, a gátló foszforilációs helyet is tartalmazó peptid elleni antitest (anti-MYPT⁶⁸⁹⁻⁷⁰²). (B): A MYPT ellenanyagok jellemzése. Teljes patkány agy lizátumot (50 µg fehérje/vályú) blottoltunk nitrocellulóz membránra és anti-MYPT¹⁻³⁸, anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ vagy anti-MYPT⁶⁸⁹⁻⁷⁰² ellenanyagokkal vizsgáltuk a keresztreakciókat.

ja, és jelzi azokat a peptidszakaszokat, amelyek ellen termeltetett antitesteket felhasználtuk kísérleteink során. Az 6B. ábrán ezen antitestek felhasználásával kapott Western blot eredményei láthatók.

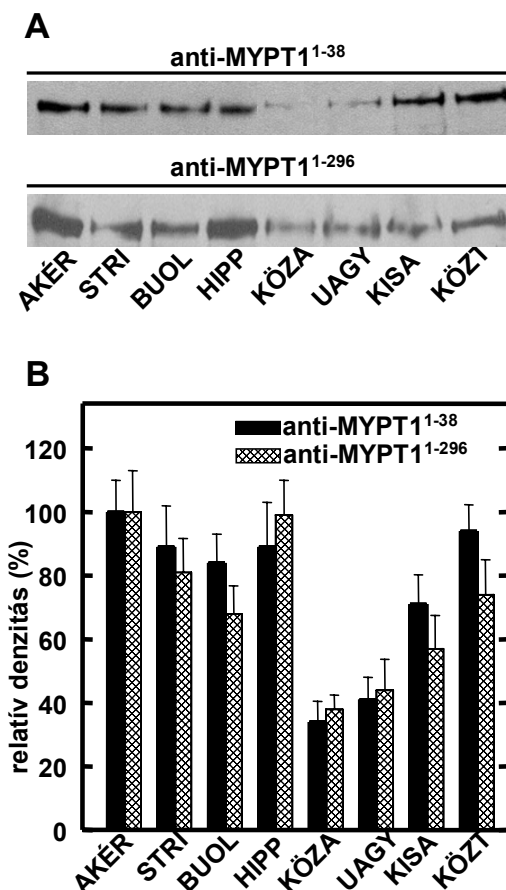
Teljes patkány agylizátumból kimutattuk mindkét MYPT izoformát. A MYPT1 N-terminális régiója ellen termeltetett ellenanyagok (anti-MYPT1¹⁻³⁸ és anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶) a kb. 130 kDa molekulatömegű MYPT1 izoformát azonosították. A MYPT1 és MYPT2 konzervált régiójára specifikus ellenanyag (anti-MYPT1⁶⁸⁹⁻⁷⁰²) két fehérjét azonosított; a felső sáv a MYPT1-nek, míg az alsó sáv feltehetően a MYPT2-nek felel meg. Ez utóbbi ellenanyaggal kapott sávok közötti intenzitás különbség arra enged következtetni, hogy az agyban a MYPT1 a fő miozin foszfatáz szabályozó alegység izoforma. Az immunoblot eredményei azt is alátámasztják, hogy az anti-MYPT1¹⁻³⁸ és anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestek specifikusak a MYPT1 izoformára, és felhasználhatók a MYPT1 mennyiségének és lokalizációjának meghatározásához a különböző agyrégiókban.

A MYPT1 expressziója különböző patkány agyrégiókban

A relatív MYPT1 tartalom és a MYPT1 expressziójának részletesebb vizsgálatához különböző agyrégiók lizátumát (50 µg fehérje) vizsgáltuk Western blot analízissel anti-MYPT1¹⁻³⁸ és anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestekkel (7A. ábra). A MYPT1 expresszióját valamennyi agyrégióban kimutattuk: viszonylag nagyobb mennyiségben volt jelen az agykéreg (*cortex*), szagló hagyma (*bulbus olfactorius*), *striatum*, *hippocampus* és köztiagy régiókban, és kisebb mennyiségben a középagy és utóagy (7B. ábra) régiókban. A két antitesttel kapott eredmények (anti-MYPT1¹⁻³⁸ vagy anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶) a MYPT1 relatív mennyiségi megoszlásának tekintetében hasonlóak voltak. Az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon határoztuk meg a MYPT1 becsült koncentrációját a tisztított His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ peptiddel kapott kalibrációs görbét használva. Az agykéregben a MYPT1 koncentrációja $72,8 \pm 18,6$ nmol/g fehérje (n=4) volt anti-MYPT1¹⁻³⁸ antitesttel, és $78 \pm 24,3$ nmol/g fehérje (n=3) az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel meghatározva.

Az agyrégiók miozin foszfatáz aktivitása

A teljes agylizátumok foszfatáz aktivitásának meghatározásához ³²P-MLC20 és ³²P-miozin szubsztrátokat használtunk (8. ábra). Mivel a ³²P-MLC20 a PP1 és a PP2A enzimek szubsztrátja is, ezért az aktivitásmérés során 2 nM okadainsavat (OA) használtunk, amely a PP2A aktivitását gátolja. Ezzel a csak PP1-nek tulajdonítható foszfatáz aktivitást részarányának meghatározása vált lehetővé. A PP2A gátlása 2 nM OA-val a teljes foszfatáz

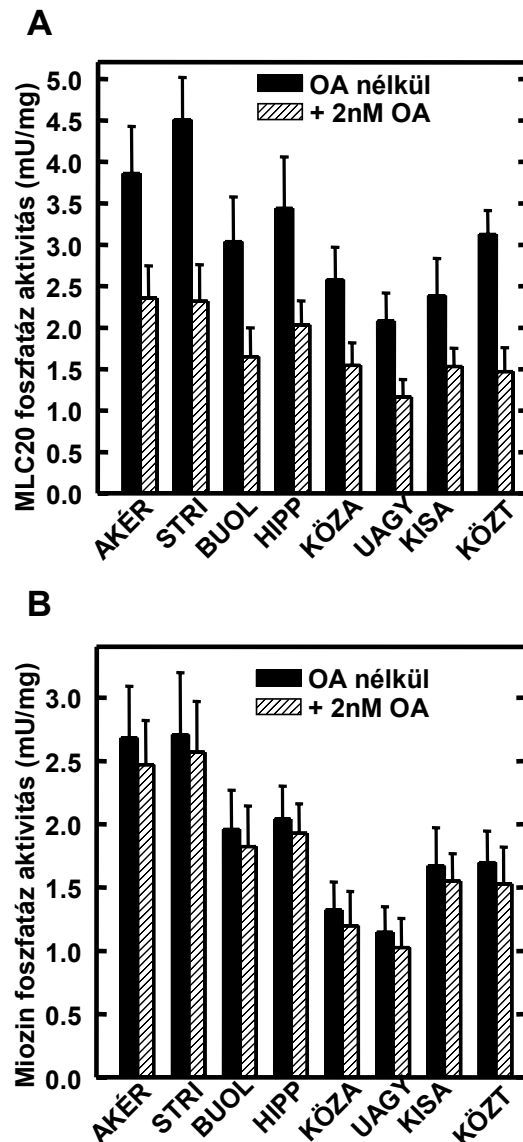


7. ábra A MYPT1 expressziója különböző agyrégiókban.

A MYPT1 eloszlását a patkány agy régiókban Western blot analízissel vizsgáltuk. Az alábbi agyrégiók lizátumait (50 µg fehérje) elemeztük: agykéreg (AKÉR); *striatum* (STRI); *bulbus olfactorius* (BUOL); *hippocampus* (HIPPI); közepagy (KÖZA); utóagy (UAGY); kisagy (KISA); köztiagy (KÖZI). A következő ellenanyagokat használtuk: (A): felső sáv, anti-MYPT1¹⁻³⁸; alsó sáv, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶. (B): Az agyrégiók relatív MYPT1 tartalmát a blotok denzitometriás elemzésével kaptuk, a denzitásokat 100%-nak tekintve az agykéreg lizátumára. A megadott értékek átlagok ± SE (n=3-5).

aktivitás 20-50 %-os csökkenését eredményezte a különböző agyrégiók lizátumában (kitöltött oszlopok), míg a fennmaradó aktivitás (csíkozott oszlopok) felel meg a PP1 aktivitásnak. Általánosan elfogadott, hogy intakt simaizom miozin (vagy a nehézlánc egy részét is tartalmazó meromiozin) csak a miozin foszfatáz holoenzimrel defoszforilálható szignifikáns mértékben (Alessi és mtsai., 1992). Ezért a foszfatáz aktivitásmérést ³²P-miozin szubszttráttal is elvégeztük, és meghatároztuk az agylizátumok miozin foszfatáz aktivitását (8B. ábra). Frissen preparált lizátumokban 2 nM OA csak kismértékű (maximum 10 %) miozin foszfatáz aktivitás gátlást eredményezett, amely arra utal, hogy a ³²P-miozint a PP2A gyakorlatilag nem defoszforilálta (8B. ábra). Az agy lizátumok ismételt fagyasztása és felolvasztása azonban a miozin foszfatáz aktivitás nagyobb mértékű gátlását eredményezte (20-30 %). Ez feltehetően a PP2A B alegysége részleges proteolízisének tulajdonítható, amely az enzimet aktiválja a foszforilált miozin iránt (Pato és Kerc, 1986). A miozin foszfatáz aktivitások

összehasonlítása azt mutatja, hogy az agykéreg, *striatum*, *bulbus olfactorius* és *hippocampus* nagyobb mennyiségű miozin foszfatázt tartalmaz, mint az utóagy vagy középgy. Az agyrégiók miozin foszfatáz aktivitása (8. ábra) hasonlóan változott, mint a Western blottal detektált MYPT1 mennyisége (ld. 7. ábra), de a *hippocampus*ban és köztiagyban mért miozin foszfatáz aktivitás alacsonyabb volt a Western blot által becsült relatív MYPT1 mennyiséghez képest.

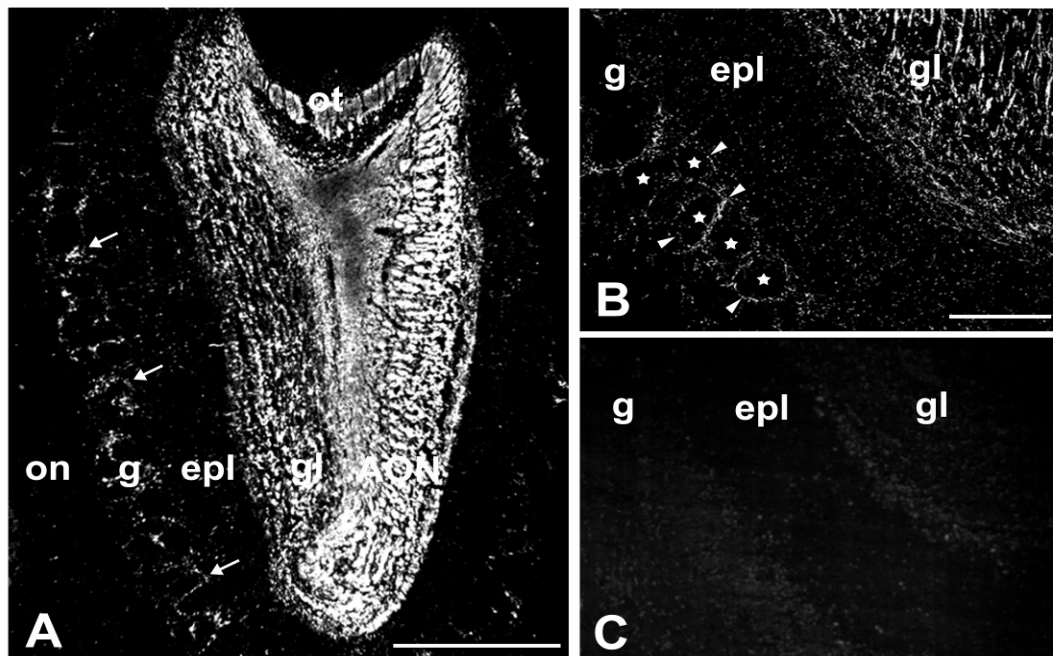


8. ábra A patkány agyrégiók lizátumának protein foszfatáz aktivitása.

A hígított patkány agy kivonatok protein foszfatáz aktivitását 2 nM okadainsav (OA) nélkül (kitöltött oszlopok), illetve 2 nM OA jelenlétében (csíkozott oszlopok) határoztuk meg 2 μ M 32 P-MLC20 (A) vagy 2 μ M 32 P-miozin szubsztráttal (B) 30 °C-on. A megadott értékek átlagok $\pm$ SE (n=3-4).

Immunhisztokémiai vizsgálatok

További vizsgálataink célja az volt, hogy immunhisztokémiai módszerekkel meghatározzuk a MYPT1 lokalizációját az agyszövetek szeleteiben. Anti-MYPT1¹⁻³⁸, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy anti-MYPT1⁶⁸⁹⁻⁷⁰² ellenanyagokat használva a MYPT1 immunreaktivitást mutatott az agy valamennyi régiójában. Előkísérleteink azonban azt igazolták, hogy az anti-MYPT1¹⁻³⁸ ellenanyaggal kapott jelek erősebbek és kontrasztosabbak voltak, mint az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy anti-MYPT1⁶⁸⁹⁻⁷⁰² ellenanyagokkal detektáltak. Ezért a további, részletesebb vizsgálatokhoz az anti-MYPT1¹⁻³⁸ antitestet használtuk. Az anti-MYPT1¹⁻³⁸ ellenanyaggal erős immunreaktivitást figyeltünk meg a *bulbus olfactorius*ban (9. ábra). A MYPT1 immunreaktív rostok kitöltötték a szaglópályát (*tractus olfactorius*), a szemcsés réteget (*stratum granulosum*) és a szagló magot (*nucleus olfactorius*) is (9A. ábra). Számos



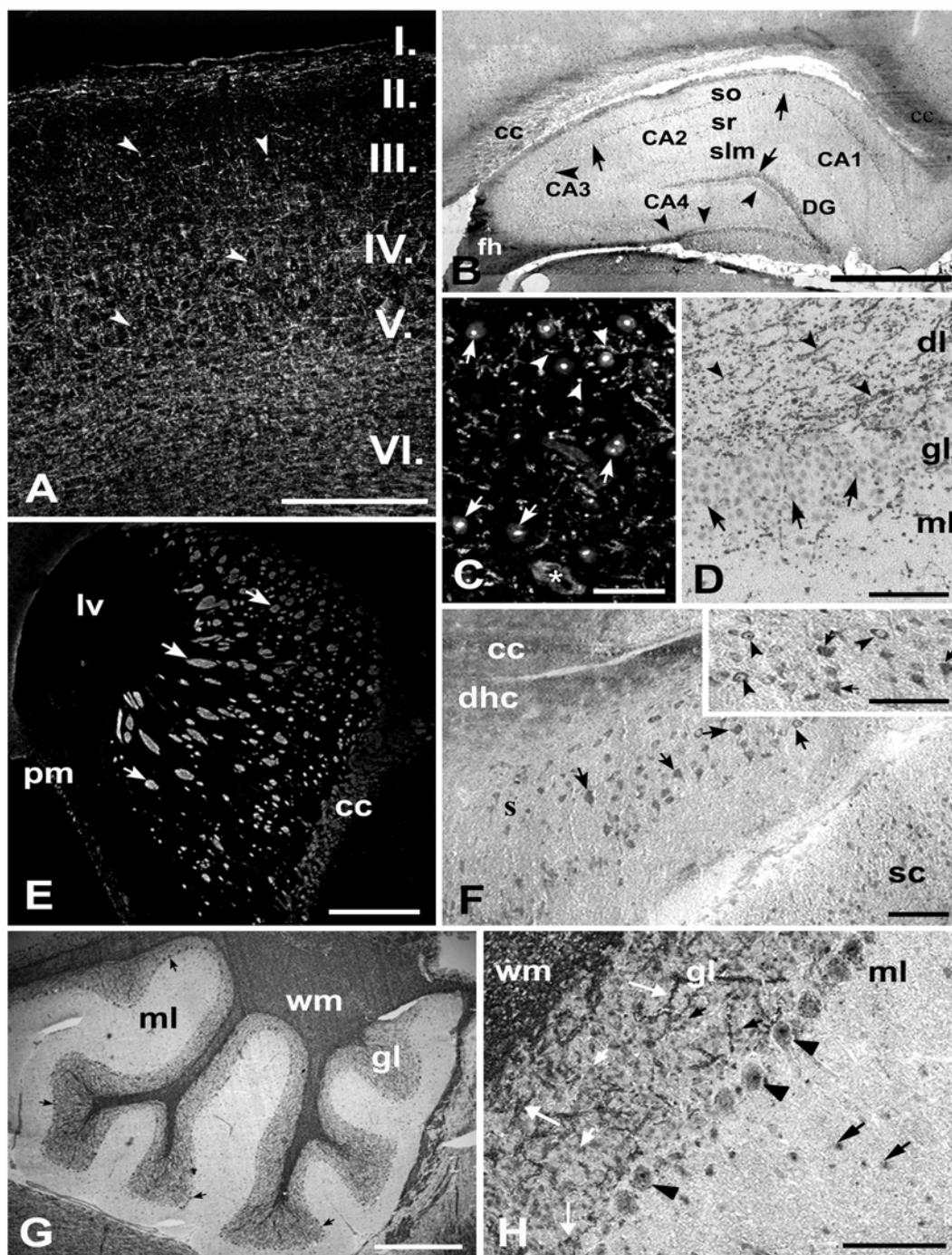
9. ábra A MYPT1 eloszlása a *bulbus olfactorius*ban.

Valamennyi metszetet PFA-val fixáltunk, és az immunreaktivitást FITC-cel konjugált másodlagos ellenanyaggal detektáltuk. (A): A teljes szerv keresztmetszetéről készült kis nagyítású képen a *nucleus olfactorius anterior* (AON), a *tractus olfactorius* (ot) és a *stratum granulosum* (gl) mutat MYPT1-immunoreaktivitást. Jelölődtek még: *nervus olfactorius* (on), glomerulusok (g), *stratum plexiform externis* (epl). Nyilak: A glomerulusok körüli MYPT1-immunreaktivitást mutató rostok. A *bulbus olfactorius* kinagyított részletén az anti MYPT¹⁻³⁸ immunreakció (B), és az ellenanyag blokkoló peptidjével történő előabszorpciót követő festődés látható (C). (B): A granuláris rétegben (gl) és a szagló glomerulusokban (csillag) lévő MYPT1-immunoreaktivitást mutató rostok (nyílhegy). Méretarány: A: 400 μ m; B and C: 100 μ m.

MYPT1 immunreaktív axon haladt át a szemcsés rétegen és a külső hálózatos rétegen (*stratum external plexiforme*), valamint a szagló glomerulusok körül (9B. ábra). A szaglóideg (*nervus olfactorius*), a mitrális sejtek és a kiegészítő mag (*bulbus olfactorius accessorius*) elemei nem mutattak MYPT1-immunreaktivitást. Az immunreakciók specificitását a *bulbus olfactorius* metszeteivel ellenőriztük. Az anti-MYPT1¹⁻³⁸ ellenanyag előinkubálása annak antigénjével (a MYPT1¹⁻³⁸ peptiddel) teljesen megszüntette a pozitív immunreakciót (9C. ábra).

A kisagy (*cerebellum*) kérgi részének szomatoszenzoros területén MYPT1-immunreaktív rostokat és sejteket mutattunk ki (10A. ábra). Valamennyi anti-MYPT1¹⁻³⁸ immunreaktív axonrost varikozitást tartalmazott, és néhány ezek közül axo-szomatikus kapcsolatokat alkotott a perikaron (idegsejttest) kérgi részével. (10C. ábra). A *hippocampus*ban a MYPT1-immunreaktivitás egyértelműen kimutatható volt a fogazott tekervény (*gyrus dentatus*) szemcsés rétegében, a piramis sejtekben (11B. ábra) és a *fimbria hippocampica*ban. Ez utóbbi beidegzi a *stratum lacunosum moleculare*, a *stratum oriens*, a piramis és szemcsés sejtek perikarionjait (10B, D. ábra). Erőteljes MYPT1 festődést mutattunk ki az olyan axonkötegekben, mint az elülső harántköteg (*commissura anterior*), a kérgestest (*corpus callosum*), a *fasciculus perforans* és a *stria terminalis*. Emelkedett MYPT1-immunoreaktivitást tapasztaltunk az *entorhinális cortex* és a subiculum sejtek sejtmagjaiban és citoplazmájában (10F. ábra). Erős MYPT1 immunreaktivitást detektáltunk a nagyagy szürke magvakban (*ganglia basalis*) is (10E. ábra). Az agyi arteriolák simaizom és endotéliális része a várttal megegyezően MYPT1-immunreaktivitást mutatott (10C. ábra). A kisagyi fehérállomány számos MYPT1-et tartalmazó idegrostja szétágazott a kisagykéreg szemcsesejtjei között (10G. ábra). A Purkinje sejtek eltérő intenzitású festődést mutattak a MYPT1-re a citoplazmában és a sejtmagban, de erős immunreaktivitást mutattunk ki a magvacskában is. Acetonnal történő fixálást követően a granulás réteg (*stratum granulare*) sejtmagjai és a molekuláris réteg (*stratum moleculare*) különböző sejtípusai MYPT1-immunreaktivitást mutattak (10H. ábra).

Számos idegsejt magvacskája mutatott MYPT1-immunreaktivitást (10A, C. ábra). Acetonnal történő fixálással az agykéreghez hasonlóan a piramidális és granulás sejtek is közepes erősségű MYPT1-immunreaktivitást mutattak (10B. ábra). Az acetonnal fixált metszetek illetve paraformaldehiddel rövid ideig fixált (1-2 perc) minták rávilágítottak arra, hogy a szomatoszenzoros agykéreg sejtmagjai is enyhe MYPT1-immunreaktivitást mutattak (10C. ábra). Különböző fixáló módszereket és fixálási időt alkalmazva megállapítottuk azt, hogy a PFA emelkedő koncentrációja és hosszabb fixálási idő megőrzi az anti-MYPT1¹⁻³⁸



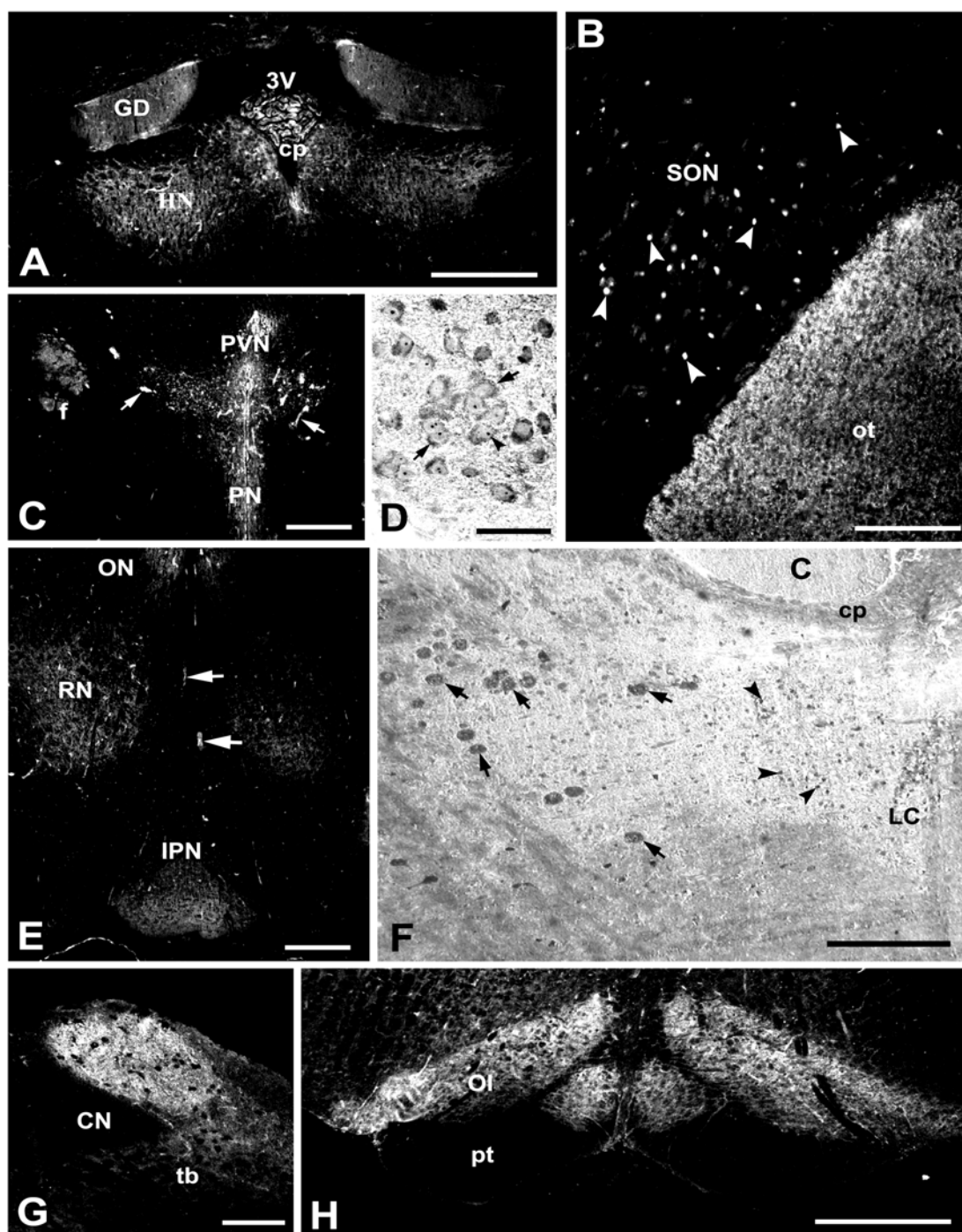
10. ábra A MYPT1 eloszlása az agykéregben és kisagyban.

Az A, C, D, E, metszeteket PFA-val, a B, F, G, H metszeteket acetonnal fixáltuk. Az immunreakciók előhívásához az A, C és E metszetek esetén avidin-FITC-et, míg a B, D, F, G, és H metszetek esetén alkalikus foszfátázt használtunk. (A): A MYPT1-immunoreaktivitást adó rostok által beidegzett szomatoszenzoros agykéreg rétegei (római számokkal jelölve). MYPT1 immunreaktív neuronok magvacskája (nyílhegy). (B): MYPT1-immunoreaktivitás a piramis és granulás rétegben (nyíl), és a *hippocampus* különböző rétegeit (nyílhegy) beidegző *fimbria hippocampica* (fh). CA1-CA4: piramis sejtek, DG: *gyrus dentatus*, so: *stratum oriens*, sr: *stratum radiatum*, slm: *stratum lacunosum-moleculare*, cc: *corpus callosum*. (C): A kisagykéreg belső piramis rétegének nagyított részlete: erősen festődő magvacskák a sejtmagban (nyíl). Idegsejtnyúlványok által a piramisisejtek perikarionján létrehozott axoszomatikus kapcsolatok (nyílhegy). Csillag: MYPT1-immunoreaktivitást mutató arteriola. (D): a *gyrus dentatus* rétegben (dl) látható MYPT1-immunoreaktív rostok (nyílhegy). A granulás sejtek sejtestjei (nyíl), gl: granulás réteg, ml: moharost réteg. (E): A *corpus*

striatumon keresztül haladó axonágak (nyíl). lv: *ventriculus laternalis*, pm: *pia mater*. (F): A subiculum sejteiben (s) a MYPT1 különböző szubcelluláris lokalizációt (citoplazma, sejtmag, magvacskák) és denzitást mutat (nyíl). cc: *corpus callosum*, dhc: *commissura dorsalis hippocampalis*, sc: *colliculus superior*. Inzert: A MYPT1-immunreaktivitást mutató subiculum sejtek nagyobb nagyítása. Nyílak: MYPT1 a sejt citoplazmájában és sejtmagjában, nyílhegyek: MYPT1 a sejt citoplazmájában és magvacskájában. (G): Festődés a kisagy fehérállományában (wm), granuláris réteg (gl), ml: molekuláris réteg. Nyíl: anti-MYPT1¹⁻³⁸ immunreaktív Purkinje sejtek sejttestje. (H): A kisagy kérgének nagyobb nagyítású képe. MYPT1 a Purkinje sejtek citoplazmájában, sejtmagjában és magvacskájában (nyílhegy). MYPT1 immunreaktivitást a molekuláris réteg (ml) és a granuláris réteg (gl) idegsejttestjeiben (nyíl). Varikozitások (hosszú nyílak). Méretarány: A, B, E és G: 500 µm; C: 50 µm; D, F inzert és H: 100 µm; F: 200 µm.

festési intenzitását az axonkötegekben és az idegsejtek sejtmagvacskáiban, de a sejtmag és a citoplazma immunreaktivitása csökkent vagy teljesen megszűnik (nem dokumentált eredmények). Az acetonnal, mint “enyhe fixálószer”-rel az anti-MYPT1¹⁻³⁸ festődés a sejtmagban és a citoplazmában láthatóbbá válik, de a festődés kevésbé megtartott az axonokban. Enyhe MYPT1 festődés jellemzi a különböző thalamikus magokat, és diffúz, de közepes erősségű festődést figyeltünk meg a szíjacsokban (*nucleus habenularis*) (11A. ábra). Erős MYPT1-immunreaktivitást mutattunk ki a látópályában (*tractus opticus*) és a boltozatban (*fornix*) (11 B, C. ábra). A paraventriculáris magok parvocelluláris része és a periventriculáris magok számos MYPT1-immunreaktív idegnyúlványt tartalmaztak (11C. ábra). A *nuclei supraopticus*ban (acetonnal fixálva) az anti-MYPT1¹⁻³⁸ antitesttel mutatott immunreakció szemcsés festődést mutatott a citoplazmában, míg erősebb intenzitású jeleket adott a PFA-val fixált metszetek magvacskájában (11B. ábra).

A középagyban, a harmadik agyideg mag központjában (*nucleus oculomotorius*), a vörösmagban (*nucleus ruber*), az emlőmagokban (*nucleus mammillaris*) és kocsányközi magokban (*nucleus interpeduncularis*) a MYPT1 erős immunreaktivitást mutatott. (11D,E. ábra). Az acetonnal fixált *nucleus mammillaris* perikarionjában erős immunreaktív felhalmozódást tapasztaltunk csakúgy, mint a *nucleus supraopticus*ban (11D. ábra). A felső és alsó ikertest rétegeiben (*stratum colliculus superior* és *inferior*) található sejtípusok közül sok adott MYPT1-immunreaktivitást a perikarionban, de igen eltérő volt a MYPT1 szubcelluláris eloszlása és a festődésének intenzitása. Szintén gyengén festődtek az anti-MYPT1¹⁻³⁸ antitesttel az agyidegek szenzoros és motoros központjai (azaz a háromosztatú (*nucleus trigeminus*), a hallóideg (*nucleus cochlearis*), helyzetérzékelő (*nucleus vestibularis*), és bolygóideg (*nucleus dorsalis vagalis*) magjai), valamint a *hippocampus*ban elhelyezkedő felső olajkamagvak (*nucleus olivae*), *nucleus cuneatus* és a *nucleus gracilis* is (11F, G, H. ábra). A MYPT1 nagy mennyiségben volt jelen a motoros háromosztatú mag (*nucleus*



11. ábra A MYPT1 jelenléte az agy különböző régióiban.

Az A, B, C, E, G, és H metszeteket PFA-val fixáltuk és avidin-FITC-cel hívtuk elő, míg D és F metszeteket acetonnal fixáltuk, AP-konjugált másodlagos ellenanyaggal jelöltük és alkalikus foszfatázra specifikus reakcióval detektáltuk. (A, B és C): a köztiagy diffúz MYPT1-immunoreaktivitása: *nucleus habenularis* (HN) (A), *tractus opticus* (ot) (B), paraventriculáris (PVN) és periventriculáris magokban (PN) (C). A *gyrus dentatus* (dg), *plexus choroidealis* (cp) (A), *nucleus supraopticus* (SON) magvacskái (nyílhegy) (B), *fornix* (f) (C) szintén MYPT1-festődést mutatott. Nyíl: MYPT1-et tartalmazó érrendszeri elemek. 3V: harmadik agykamra. (D): Aceton fixálással a *nucleus mammillaris* sejttestjeinek citoplazmájában felhalmozódott MYPT1 (nyíl) és magvacskái (nyílhegy). (E): A középagyban: *nucleus oculomotorius* (ON), *nucleus ruber* (RN), *nucleus interpeduncularis* (IPN). Nyíl: MYPT1-et tartalmazó érrendszeri elemek. (F) Az agytörzs hosszanti (szagittális) metszete: a MYPT1 jelenléte a *locus ceruleus* (LC) környéki *nervus trigeminus* motoros

magjai (nyíl) és a kis sejtek (nyílhegy) sejttestjeiben. Kisagy (C), *cerebellum peduncularis* (cp). (G és H): Az utóagy: MYPT1 festődést *nucleus cochlearis*ban (CN) (G) és az *oliva inferior*ban (IO) (H). tb: trapéztest, pt: piramispálya. Méretarány: A, C, E, F, G és H: 400 µm; B: 200 µm; D: 50 µm.

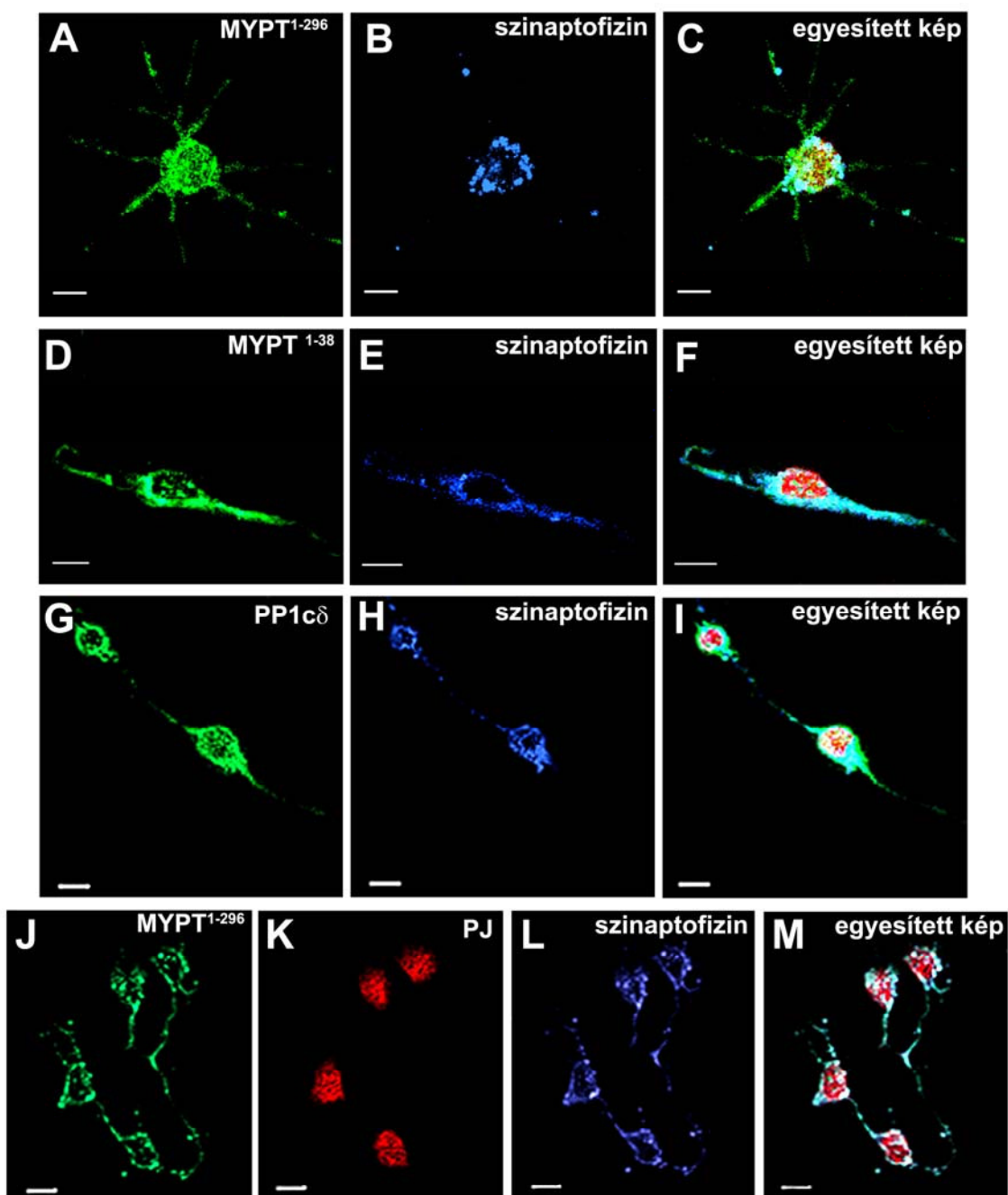
trigeminalis) nagy perikarionjában, a kékmagban (*locus cereuleus*) és a hálózatos rendszerben szétszórtnan kimutatható perikarionokban.

A fenti adatok alátámasztják a MYPT1 idegrendszeren belüli jelenlétét, de az immunfestődés mintázata felveti annak lehetőségét, hogy a glia sejtek szintén tartalmazhatnak MYPT1-et. Erős MYPT1 immunreaktivitás mutatható kis a *corpus callosum* (10B, F. ábra) és a kisagy fehérállományában (10G, H. ábra), ami a MYPT1 jelenlétére utalhat az oligodendroglia sejtekben. Közepes immunreaktivitás detektálható az agy jól körbehatárolt régiói, mint pl. a *subiculum* idegsejtjei között (10F. ábra) vagy a trigeminális ideg motoros magjaiban (11F. ábra), ami szintén alátámasztja a MYPT1 jelenlétét a glia sejtekben.

A miozin foszfatáz lokalizációja immunfluoreszcenciával hippocampus és nucleus cochleáris primer sejt kultúrákban

Az első képsorozat a primer *hippocampus* sejtek MYPT1 és szinaptofizin elleni antitestekkel történő jelölését mutatja (12A.-F. ábra). A szinaptofizin preszinaptikus markerként ismert, valamint segít a kevert primer sejt kultúrákban a neuronok specifikus megkülönböztetésében az asztrocitáktól, amelyek szintén festődtek az anti-MYPT1 antitestekkel. A MYPT1 a *hippocampus* neuronokban az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és az anti-MYPT1¹⁻³⁸ ellenanyagokkal a citoplazmában és a sejtmagban is jelen volt (12A. és D. ábra). A MYPT1 a perinukleáris régióban és az idegsejtnyúlványok mentén kolokalizálódott a szinaptofizinnel (12C. és F. ábra). A *hippocampus* sejtekben a PP1cδ a perikarionban koncentrált (12G. ábra), csak gyenge festődést mutatott a nyúlványokban, de szintén részleges kolokalizációt mutatott a szinaptofizinnel (12G, H és I. ábra).

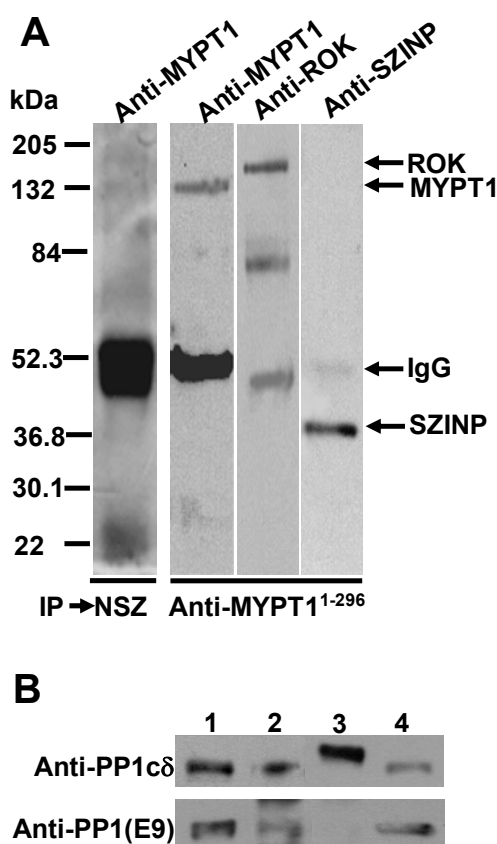
A *nucleus cochlearis* neuronok diffúz MYPT1 szubcelluláris lokalizációt mutattak főként a citoplazmában és az idegsejtnyúlványokban (12J. ábra). A sejtek z metszetű optikai szeletelése gyenge festődést jelzett a *nucleus cochlearis* sejtek sejtmagjában. A MYPT1 szinaptofizinnel szintén kolokalizációt mutatott a sejttestben (12J, L és M ábra). A *nucleus cochlearis* sejt kultúrában a PP1cδ diffúz festődést mutatott a citoszolban és kolokalizációt mutatott a szinaptofizinnel, de nem volt nagyobb mennyiségben jelen a sejt kontaktusokban (nem dokumentált eredmények).



12. ábra A *MYPT1* immunfluoreszcens lokalizációja neuronális primer sejt kultúrákban. Három napos patkány *hippocampus*ából származó idegsejteket négy napig növesztettük sejt kultúráként, majd immunfluoreszcens festést követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (A-I) a következő antitestekkel: anti-MYPT¹⁻³⁸ (zöld) (A), anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ (zöld) (D), anti-szinaptofizin (kék) (B, E, H) vagy anti-PP1cδ (zöld) (G). A sejtek sejtmagjának festéséhez (vörös) propidium jodidot (PJ) használtunk. Az egyesített képeken (C, F és I) a fehér szín jelöli a MYPT1 kolokalizációját PP1c-vel vagy szinaptofizinnel. A PP1cδ a sejtestest széli részén volt jelen (G), és foltokban kolokalizált a szinaptofizinnel (I). A *nucleus cochlearis*ból származó idegsejteket (J-M) szintén immunfluoreszcensen festettünk majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltunk anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ (zöld) (J) vagy anti-szinaptofizin ellenanyaggal (kék) (L), a sejtmagot propidium jodiddal (PJ) tettük láthatóvá (vörös) (K). Az egyesített kép (M) fehér színe a MYPT1 kolokalizációját jelenti szinaptofizinnel. A MYPT1 a *nucleus cochlearis* sejtekben is kolokalizált a szinaptofizinnel (M). Méretarány: 5 μm.

MYPT1-kölcsönható neuronális fehérjék azonosítása hippocampus kivonatból immunoprecipitációval

A lehetséges MYPT1-gyel kölcsönható, agyban található fehérjék kimutatásához immunoprecipitációt végeztünk anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel. A kísérletet mindegyik agyrégióból származó mintákon elvégeztük, és hasonló eredményt kaptunk. A 13. ábrán bemutatott eredmények a *hippocampus* agyrégió lizátumából származó mintával készültek. Az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel kapott immunprecipitátumot Western blot analízissel vizsgáltuk és kimutattuk a ROK, a szinaptofizin (13A. ábra) és a PP1c izoformák (13B. ábra) jelenlétét. Előzetesen leírták, hogy különböző szövetekben és sejtekben a ROK kötődik a



13. ábra A MYPT1 immunprecipitációja hippocampus kivonatból anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶

ellenanyaggal: a ROK, szinaptofizin és PP1c izoformák koprecipitációja MYPT1-gyel.

(A): Az immunprecipitációhoz (IP) *hippocampus* kivonatot használtunk, amit affinitás tisztított anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ ellenanyaggal vagy kontrollként nem-immun nyúl szérummal (NSZ) inkubáltunk. Az immunprecipitátumot anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-ROK és anti-szinaptofizin (anti-SZINP) ellenanyagokkal vizsgáltuk. A NSZ-mal végzett immunoprecipitációval csak a nyúl IgG-t azonosítottuk Western blot analízissel anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ ellenanyagot használva. (B): A PP1c izoformák azonosítása a *hippocampus* kivonatból kapott immunprecipitátumban. Teljes *hippocampus* kivonatot (1), *hippocampus* kivonatból kapott anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ immunprecipitátumot (2) és tisztított, hesztahisztidin taggal expresszált PP1c δ (3) és tisztított nyúl vázizom PP1c-t (4) immunoblott után poliklonális anti-PP1c δ és monoklonális anti-PP1c (E9) ellenanyagokkal vizsgáltunk.

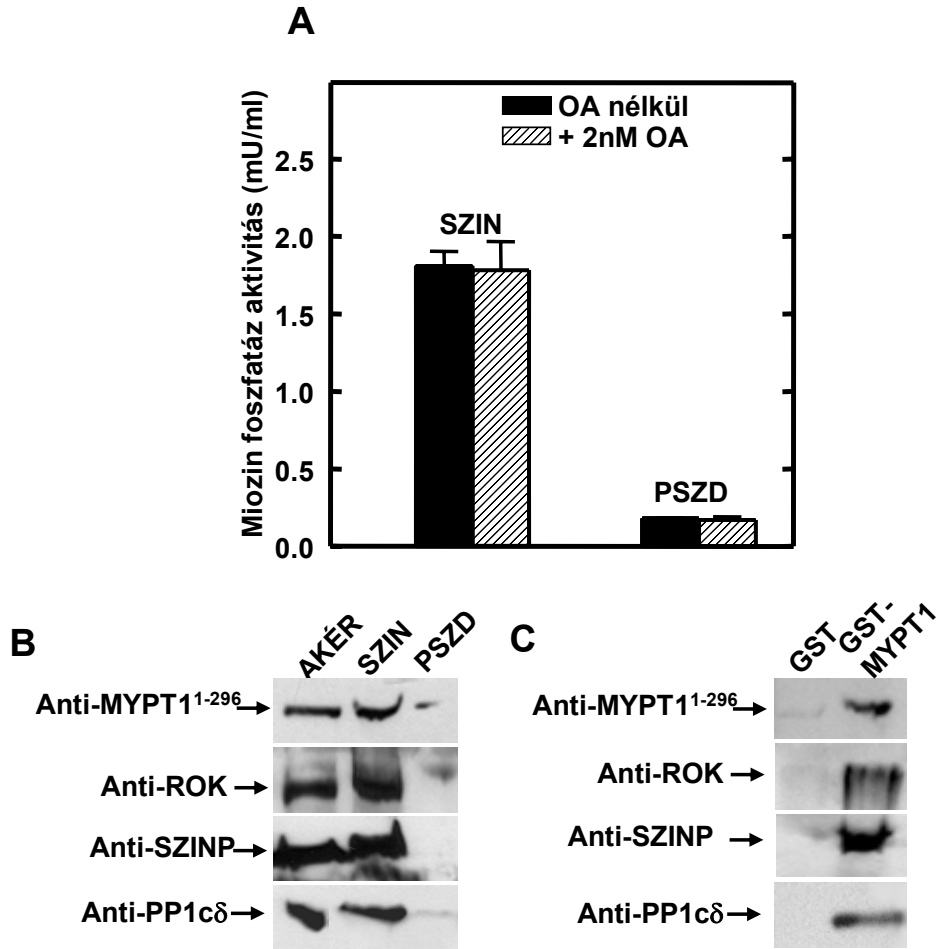
MYPT1-hez, és azt is igazolták, hogy a ROK legalább két oldalláncon (Thr695 és Thr850) foszforilálja a MYPT1-et (Feng és mtsai., 1999a, 1999b). A 13A. ábrán látható, hogy a ROK (~160 kDa fehérje és egy hozzávetőlegesen ~80 kDa proteolitikus fragment) a MYPT1-gyel koprecipitálódott, ami a két fehérje szoros kapcsolatára utal neuronális sejtekben. A szinaptofizin jelenléte az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ ellenanyaggal végzett immunprecipitátumban némileg meglepő, de tekintettel arra, hogy a szinaptofizin egy foszforfehérje, ezek az adatok arra is utalhatnak, hogy a szinaptofizin a miozin foszfatáz egyik neuronális szubsztátja lehet.

A különböző PP1c izoformák jelenlétének vizsgálatához az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ immunprecipitátumot PP1c-re specifikus antitestekkel vizsgáltuk (13B. ábra). A PP1c δ -ra specifikus antitest (anti-PP1c δ) keresztreakciót adott a *hippocampus* kivonattal, és az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ immunprecipitátummal, valamint a tisztított rekombináns PP1c δ , és vázizomból izolált PP1c-vel is. Ez utóbbi feltehetően a PP1c izoformák keverékének felel meg. A monoklonális ellenanyag (anti-PP1c (E9)) csak a tisztított nyúl vázizom PP1c-vel mutatott keresztreakciót, a rekombináns PP1c δ izoformával nem. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az ellenanyag PP1c δ -tól eltérő izoformákat (feltehetően PP1c α és γ 1) ismer fel. Ugyanezen antitesttel analizálva pozitív keresztreakciót kaptunk a *hippocampus* kivonattal és az immunprecipitátummal is. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PP1c δ -tól eltérő izoformák is kötődhetnek a MYPT1-hez, vagy az immunprecipitátum komponense(i)hez.

A miozin foszfatáz aktivitás, a MYPT1 és a MYPT1-gyel kölcsönható fehérjék eloszlása a szinaptoszóma és posztszinaptikus denzitás frakciókban

A MYPT1 és a szinaptofizin kölcsönhatása arra utal, hogy a miozin foszfatáz a szinaptikus vezikulák egyik fő foszfatázkomponense lehet. Szinaptoszóma és posztszinaptikus denzitás frakciókat izoláltunk, és vizsgáltuk a miozin foszfatáz, MYPT1 és a MYPT1-gyel kölcsönható fehérjék (ROK, szinaptofizin és PP1c δ) eloszlását (14. ábra). A 14A. ábra adatai arra utalnak, hogy a miozin foszfatáz aktivitás a szinaptoszómában magas, ezzel szemben viszonylag alacsony a posztszinaptikus denzitás frakcióban. A miozin foszfatáz aktivitást az OA (2 nM) nem befolyásolta, ami megerősíti, hogy a foszfatáz aktivitás elsősorban PP1 enzimnek tulajdonítható. A Western blot analízis eredményei szerint a MYPT1, ROK és PP1c δ nagyobb mennyiségben volt jelen a szinaptoszómákban, mint a posztszinaptikus denzitásokban, míg a szinaptofizint csak a szinaptoszómákban mutattuk ki. A MYPT1, a ROK, a szinaptofizin valamint a PP1c δ között kialakuló kölcsönhatást alátámasztotta GST-MYPT1-el végzett precipitáció (pull-down assay) is (14C. ábra). A

precipitátumból specifikus antitestekkel elvégzett Western blot analízis kimutatta a ROK, a szinaptofizin és a PP1c δ jelenlétét a pull-down frakciókban. A kontrollként GST-vel végzett pull-down során az előbbi fehérjék nem voltak kimutathatók.

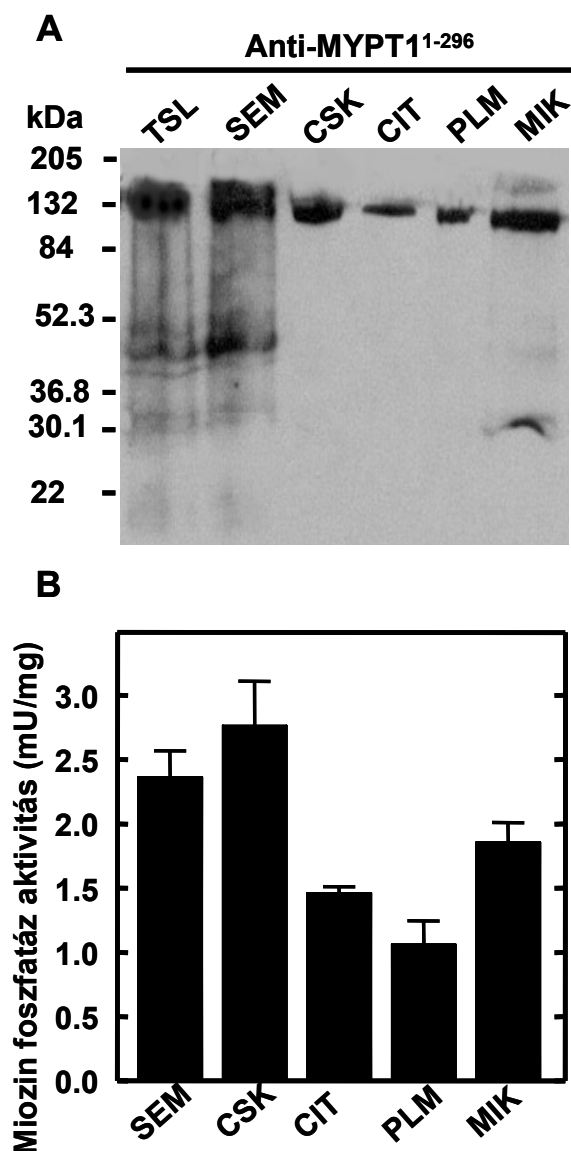


14. ábra A miozin foszfatáz aktivitás, a MYPT1, a ROK, a szinaptofizin és a PP1c δ eloszlása az agykérgi szinaptoszómákban és posztszinaptikus denzitásokban.

(A): A miozin foszfatáz aktivitást a hígított szinaptoszóma (SZIN) és posztszinaptikus denzitások (PSZD) preparátumokban $2\ \mu\text{M}$ ^{32}P -miozin szubsztráttal határoztuk meg $2\ \text{nM}$ OA nélkül (kitöltött oszlopok) vagy annak jelenlétében (csíkozott oszlopok). (B): Az agykérgi kivonat (AKÉ), a szinaptoszóma (SZIN) és posztszinaptikus denzitás (PSZD) preparátumok Western blot analízise anti-MYPT1¹¹⁻²⁹⁶, anti-ROK, anti-SZINP és anti-PP1c δ ellenanyagokkal. (C): A ROK, SZINP és PP1c δ , mint MYPT1 kölcsönható fehérjék azonosítása a szinaptoszómában a glutation-Sepharose-zal végzett GST (kontroll) vagy GST-MYPT1 pull-down vizsgálattal.

A MYPT1 azonosítása és a miozin foszfataz aktivitás meghatározása HepG2 szubcelluláris frakciókban

A szubcelluláris frakciókat HepG2 sejtlyizátumból izoláltuk az Anyagok és módszerekben leírt módon, és a MYPT1 jelenlétét a frakciókban Western blot analízissel mutattuk ki anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestet használva. A MYPT1-et valamennyi frakcióban kimutattuk (15A. ábra). A sávok denzitásának összehasonlítása alapján a MYPT1 nagyobb



15. ábra A MYPT1 és a miozin foszfataz aktivitás eloszlása HepG2 szubcelluláris frakciókban.

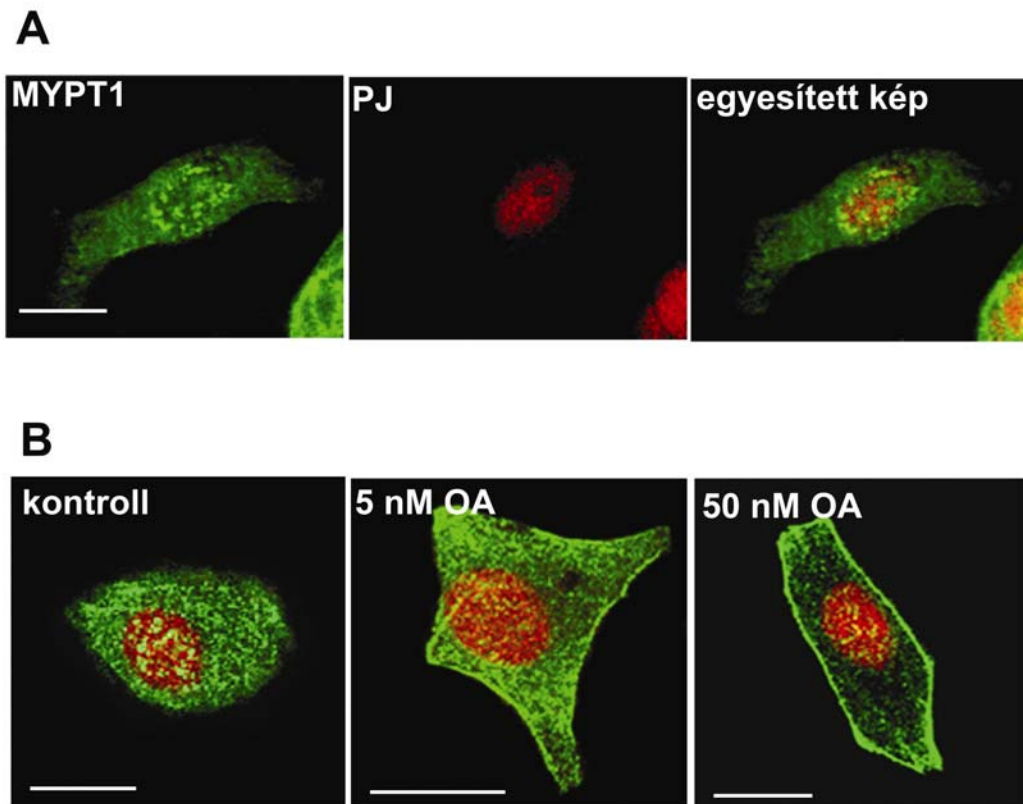
(A) A HepG2 sejtekből származó szubcelluláris frakciókat (TSL: teljes sejtlyizátum, SEM: sejtanyag; CSK: citoszkeleton; CIT: citoszol; PLM: plazma membrán; MIF, mikroszóma-mitochondrium) az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján készítettük és a fehérjéket (50 µg) SDS-PAGE-sel választottuk el, majd immunoblot-tal vizsgáltuk anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ ellenanyaggal. (B) A HepG2 szubcelluláris frakciók miozin foszfataz aktivitása ³²P-miozin szubsztráttal. A megadott értékek átlagok ± SE (n=3).

koncentrációban van jelen a sejtmagban, citoszkeletonban és a mikroszóma-mitokondrium frakciókban, míg viszonylag kisebb mennyiségben a citoszolban és a plazmamembrán frakcióban. A foszfatáz aktivitást a HepG2 szubcelluláris frakciókban ^{32}P -miozin szubszttráttal vizsgáltuk (15B. ábra). Ismert, hogy a MYPT1 a PP1c aktivitását a foszforilált miozin szubszttrát iránt sokszorosára növeli. Az 15B. ábrán látható, hogy a citoszolban és plazmamembrán frakciókban kisebb miozin foszfatáz aktivitás mutattunk ki, mint a sejtmagban, citoszkeletonban és a mitokondrium-mikroszóma frakciókban. Így a HepG2 szubcelluláris frakciókban a miozin foszfatáz aktivitás eloszlása hasonló volt a Western blot analízissel kapott MYPT1 szintekhez (15A. ábra), összhangban azzal, hogy a MYPT1 nagymértékben befolyásolja a miozin foszfatáz aktivitást.

A MYPT1 lokalizációjának kimutatása HepG2 sejtekben konfokális mikroszkópiával

A MYPT1 eloszlását a HepG2 sejtekben konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal vizsgáltuk. A MYPT1 kimutatására anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestet, majd fluoreszcensen jelölt második antitestet használtunk (16A. ábra, bal). A MYPT1 festődést mutatott a citoplazmában és foltszerű szerkezetekben koncentrált a sejtmagban. A sejtmagot propídium-jodiddal festettük (16A. ábra, középső). Az egyesített kép a jobb panelban látható (16A. ábra), és szintén a MYPT1 sejtmagon belüli jelenlétére utal. Valamennyi vizsgált sejten a konfokális mikroszkóp programjával z-tengely irányú rétegfelvételt készítettünk, amellyel igazoltuk a MYPT1 sejtmagon belüli lokalizációját (nem dokumentált adatok).

További vizsgálataink során tanulmányoztuk a foszfatázok PP1 és PP2A típusát is gátló okadainsav (OA) hatását a miozin II 20 kDa könnyű lánc (MLC20) és a MYPT1 lokalizációjára és foszforilációjára a HepG2 sejteken. Előzetes kísérleteink szerint OA 0,5 nM-1 μM koncentráció tartományban eltérően befolyásolta a sejtek viselkedését. 1 nM OA nem volt hatással a szérum-éheztetett sejtekre a 60 perces inkubálási idő alatt, míg 100 nM vagy attól nagyobb koncentrációjú OA kezelés a sejtek életképességét jelentős mértékben (30-50 %) befolyásolta. Emiatt az OA-t 5-50 nM koncentrációban alkalmaztuk kísérleteinkben. Az OA mélyreható változásokat indukált a MYPT1 lokalizációjában a HepG2 sejtekben (16B. ábra): 5 nM OA hatására a MYPT1 részlegesen transzlokálódott a citoszolból a plazmamembránba (16B. ábra, középső), míg 50 nM OA (16B. ábra, jobb) kezelés hatására a MYPT1 még jelentősebb mértékű koncentráldását figyeltük meg a plazmamembránban. A MYPT1 sejtmagban mutatott festődése jelentősen nem változott OA jelenlétében.

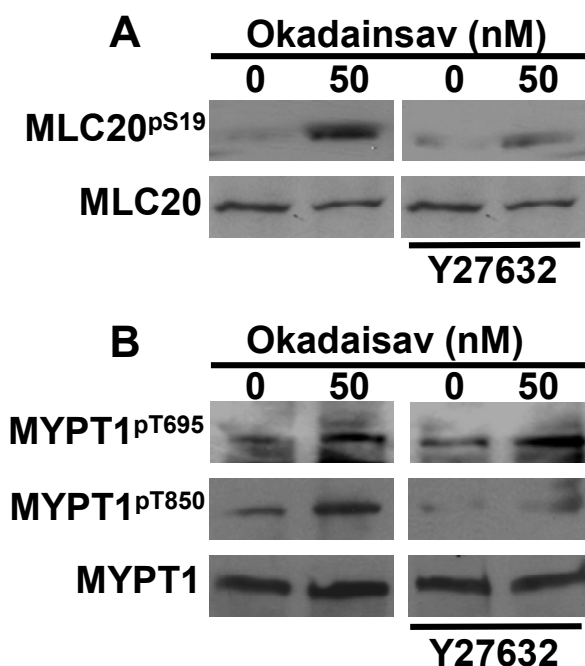


16. ábra A MYPT1 lokalizációja HepG2 sejtekben konfokális mikroszkópiával. (A) A HepG2 sejteket anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ ellenanyaggal festettük (zöld, bal panel). A sejtmagokat propidium jodiddal (vörös, középső panel) festettük. Egyesített kép (jobb panel). (B) A MYPT1 festése HepG2 sejtekben anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ ellenanyaggal (zöld) OA nélkül (bal), és 5 nM OA (középső) illetve 50 nM OA (jobb) kezelést (60 perc) követően. Méretarány: 10 μ m.

Az OA hatása a MLC20 és a MYPT1 foszforilációjára

A következőkben az OA kezelés hatását vizsgáltuk a MLC20 Ser19 oldalláncon, illetve a MYPT1 Thr695 (a gátló foszforilációs hely, melyet a ROK és más kinázok is foszforilálnak) és a Thr850 (a ROK által foszforilált) oldalláncokon történő foszforilációjára HepG2 sejtekben. Mivel a ROK az MLC20 Ser19 oldalláncát is foszforilálhatja, ezért az OA hatását specifikus ROK inhibitor (Y27632) jelenlétében is vizsgáltuk. A fehérjék foszforilációs szintjét az MLC20 és a MYPT1 foszforilációs helyeire specifikus antitestek segítségével Western blot analízissel végeztük (17. ábra).

A Ser19 MLC20 foszforilációja a nem-kezelt sejtekben viszonylag alacsony volt (17A. ábra), amely 50 nM OA jelenlétében jelentősen növekedett. A sejtek Y27632 inhibitorral történő előkezelése részlegesen gátolta a Ser19 oldallánc foszforilációját, kezelés nélkül vagy 50 nM OA jelenlétében is. A 17B. ábrán látható, hogy 50 nM OA jelenlétében a MYPT1 kezelés előtt detektált foszforilációja mind a Thr695 és a Thr850 oldalláncokon növekedett. Az OA által kiváltott foszforilációt az Y27632 kezelés a Thr695 oldalláncon csak kis mértékben, míg a Thr850 oldalláncon jelentős mértékben gátolta.



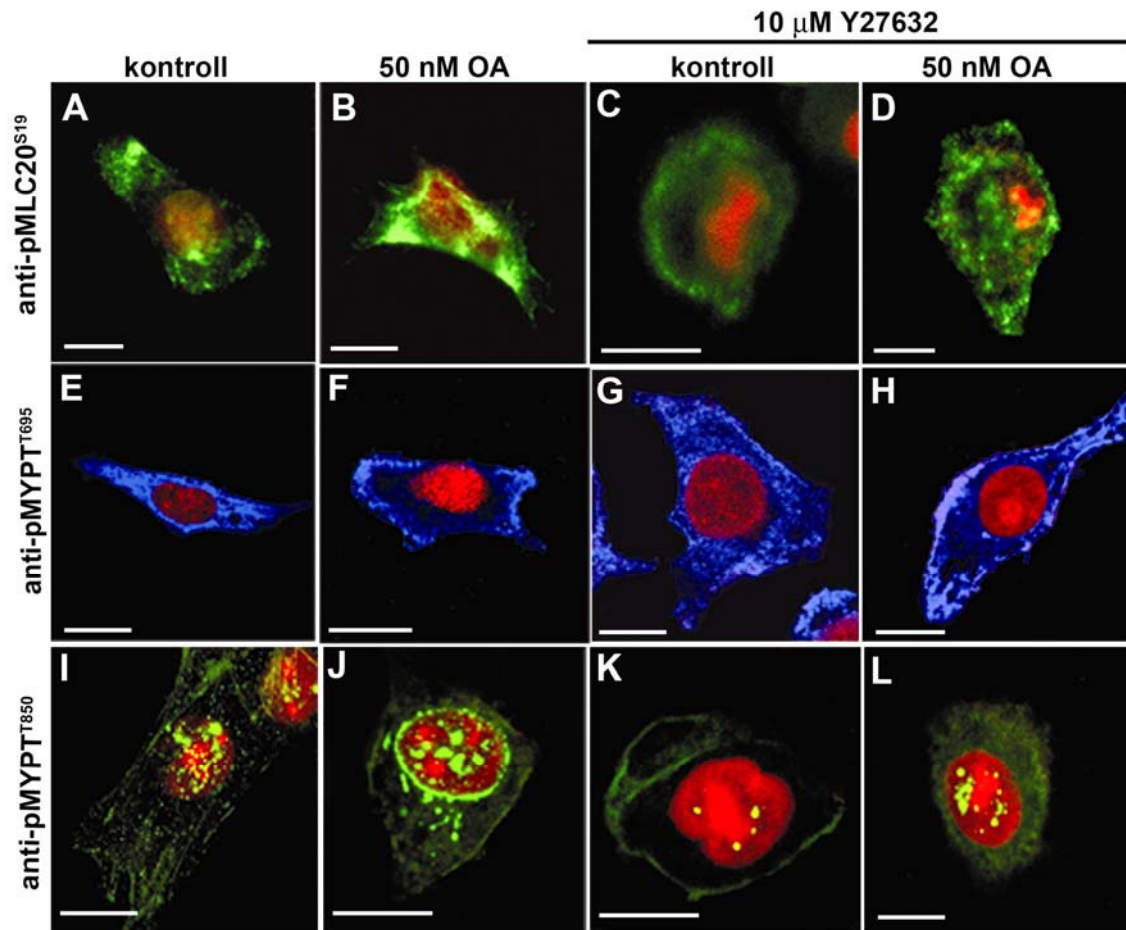
17. ábra Az OA és Y27632 hatása a MLC20^{S19}, MYPT^{T695} és MYPT^{T850} foszforilációs szintjére.

Szérum-éheztetett HepG2 sejteket inkubáltunk (60 perc, 37 °C) effektorok nélkül vagy 50 nM OA és 10 μM Y27632 együttes jelenlétében. A sejteket homogenizáltuk és a fehérjéket az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján készítettük elő az immunoblotthoz. Mindegyik mintából 70 μg fehérjét analizáltunk A, anti-MLC20^{pS19} (felső sávok), anti-MLC20 (alsó sávok); B, anti-MYPT^{pT696} (felső sávok), anti-MYPT^{pT850} (középső sávok) és anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ (alsó sávok) ellenanyagokkal.

Foszforilált MLC20 és foszforilált MYPT1 fehérje lokalizációja konfokális mikroszkóppal

A MLC20 és a MYPT1 foszforilált formáinak OA-kezelés által kiváltott lokalizációs változását tanulmányoztuk HepG2 sejtekben foszfospecifikus antitestekkel végzett festéssel, konfokális mikroszkópia segítségével (18. ábra). Az OA kezelés hatására a MLC20 foszforilációja a Ser19 oldalláncon (MLC20^{pSer19}) viszonylag alacsony volt és a MLC20^{pSer19} festődés elsősorban a sejt perifériális részére lokalizálódott (18A. ábra). 50 nM OA kezelés növelte a MLC20 foszforilációs szintjét, és a festődés a sejt központi részén erősebbé vált, valamint részben filamentális sajátságokat is mutatott (18B. ábra). OA és Y27632 együttes alkalmazásakor a MLC20^{pSer19} festődése főként perifériális eloszlást mutatott (18C. ábra). Az OA-által kezelt sejtekben az Y27632 gyengítette a MLC20^{pSer19} festődését, és a perifériás festődés mellett szétszórt pontszerű foltokat is megfigyelhettünk (18D. ábra).

A Thr695 oldalláncon foszforilált MYPT1 (MYPT1^{pThr695}) homogén eloszlású festődést mutatott a kezeletlen sejtek citoplazmájában és nem volt detektálható a HepG2 sejtek magjában (18E. ábra). 50 nM OA kezelést követően a MYPT1^{pThr695} festődés a 18B. ábrán bemutatott lokalizációs sajátosságokhoz hasonlóan a citoplazmából a plazmamembránba transzlokálódott (18F. ábra). Kisebb sejthalak változásokat leszámítva 10 μ M Y27632 önmagában nem befolyásolta a MYPT1^{pThr695} lokalizációját (18G. ábra). 50 nM OA az



18. ábra Az OA és Y27632 hatása a pMLC20^{S19}, pMYPT^{T695} és pMYPT^{T850} foszforilációjára és lokalizációjára HepG2 sejtekben.

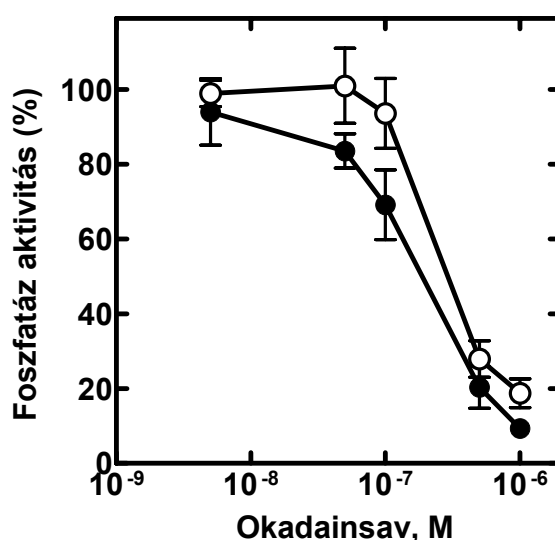
Szérum-éheztetett HepG2 sejteket effektorok nélkül (13A, E, I) vagy 50 nM OA (13B, F, J), vagy 10 μ M Y27632 (13C, G, K) vagy 10 μ M Y27632 és 50 nM OA (13D, H, L) jelenlétében 60 percig inkubáltunk. A sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk és anti-MLC20^{pS19} (A-D, zöld), monoklonális anti-MYPT1^{pT695} (E-H, kék) és anti-MYPT1^{pT850} (I-L, zöld) ellenanyagokkal festettük. A sejtmagokat propidium jodiddal festettük (vörös). Méretarány: 10 μ m.

Y27632 inhibitorral történő előkezelést követően csak részleges MYPT1^{pThr695} transzlokációt eredményezett a plazmamembránba (18H. ábra). Kezeletlen HepG2 sejtekben a Thr850 oldalláncon foszforilált MYPT1-et (MYPT1^{pThr850}) főként a sejtmagban detektáltuk, a citoplazmában csak gyenge, homogén eloszlású festődést észleltünk (18I. ábra). OA kezelés

hatására a MYPT1^{pThr850} festődés intenzitása növekedett a sejtmagban és a perinukleáris régióban is (18J. ábra). Az Y27632 inhibitor nagymértékben csökkentette a MYPT1^{pThr850} festődést az OA jelenlétében (18L. ábra) és hiányában is (18K. ábra).

Az OA hatása a miozin foszfatáz és PP2A aktivitására teljes sejt-lizátumban

A viszonylag alacsony OA koncentráció által kiváltott foszforilációs és lokalizációs változások felvetik azt a kérdést, hogy vajon az OA a miozin foszfatáz holoenzimet közvetlenül gátolja-e, vagy más, az OA-ra érzékenyebb foszfatázokon (pl. PP2A) keresztül hat. A ³²P-miozin és az izolált ³²P-MLC20 szubsztrátok segítségével minimálisan (kétszeresre) hígított teljes HepG2 lizátum foszfatáz aktivitását mértük különböző OA koncentrációk (5, 50, 100, 500 és 1000 nM) jelenlétében. A szubsztrát koncentrációját (0,5 µM) és a reakcióidőt (0,5-1 perc) úgy állítottuk be, hogy a maximális szubsztrát átalakulás kb. 40% legyen. Az OA 5-100 nM koncentrációban nem befolyásolta, viszont 0,5-1 µM OA koncentrációban már csökkentette a miozin foszfatáz aktivitást (19. ábra). Ezek az adatok is arra utalnak, hogy a miozin foszfatáz holoenzimet, az OA 100 nM-nál nagyobb koncentrációban gátolja, olyan körülmények között, amikor a protein foszfatázok koncentrációja a sejtben lévő koncentrációhoz hasonló. Ezzel ellentétben a PP1 és PP2A

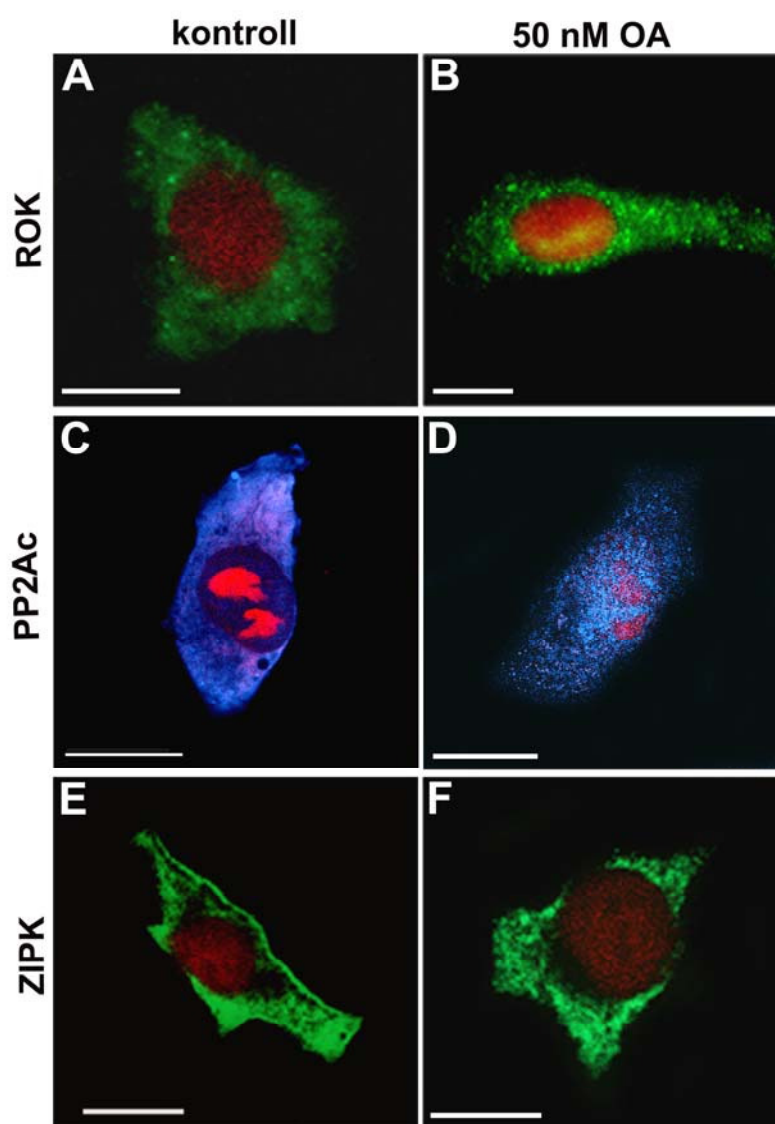


19. ábra Az OA hatása a miozin foszfatáz aktivitásra HepG2 sejt-lizátumban.

A foszfatáz aktivitást kétszeresére hígított HepG2 sejt-lizátumból ³²P-miozin (○) vagy ³²P-MLC20 (●) szubsztrátokkal határoztuk meg különböző OA koncentrációt alkalmazva. 100%-ként az OA nélkül mért foszfatáz aktivitást tekintettük. Az értékek átlagok ± SE (n=3).

szubsztrátjául is szolgáló ^{32}P -MLC20 defoszforilációját már 5-100 nM OA is gátolta, ami arra utal, hogy a PP2A aktivitás gátlása már alacsonyabb toxinkoncentrációnál is megvalósul. A fenti eredmények tükrében levonható a következtetés, hogy HepG2 sejtekben 5-50 nM OA a PP2A-t gátolja, míg a PP1-re, illetve a miozin foszfátázra, nincs közvetlenül hatással. Ez a következtetés összhangban van azokkal az előzetes eredményekkel, amelyek szerint a sejtekben lévő PP1 aktivitásra még 1 μM OA sem volt hatással (Favre és mtsai., 1997).

A ROK, PP2A és a ZIPK lokalizációja HepG2 sejtekben



20. ábra A ROK, PP2Ac és ZIPK eloszlása HepG2 sejtekben.

Szérum-éhezett HepG2 sejteket inkubáltunk 50 nM OA nélkül (A, C, E) vagy annak jelenlétében (B, D, F) 60 percig. A HepG2 sejteket etanollal (A, B, E és F) vagy PFA-val (C és D) fixáltuk, permeabilizáltuk és anti-ROK (A és B), anti-PP2Ac (C és D) vagy anti-ZIPK (E és F) ellenanyagokkal festettük, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Méretarány: 10 μm .

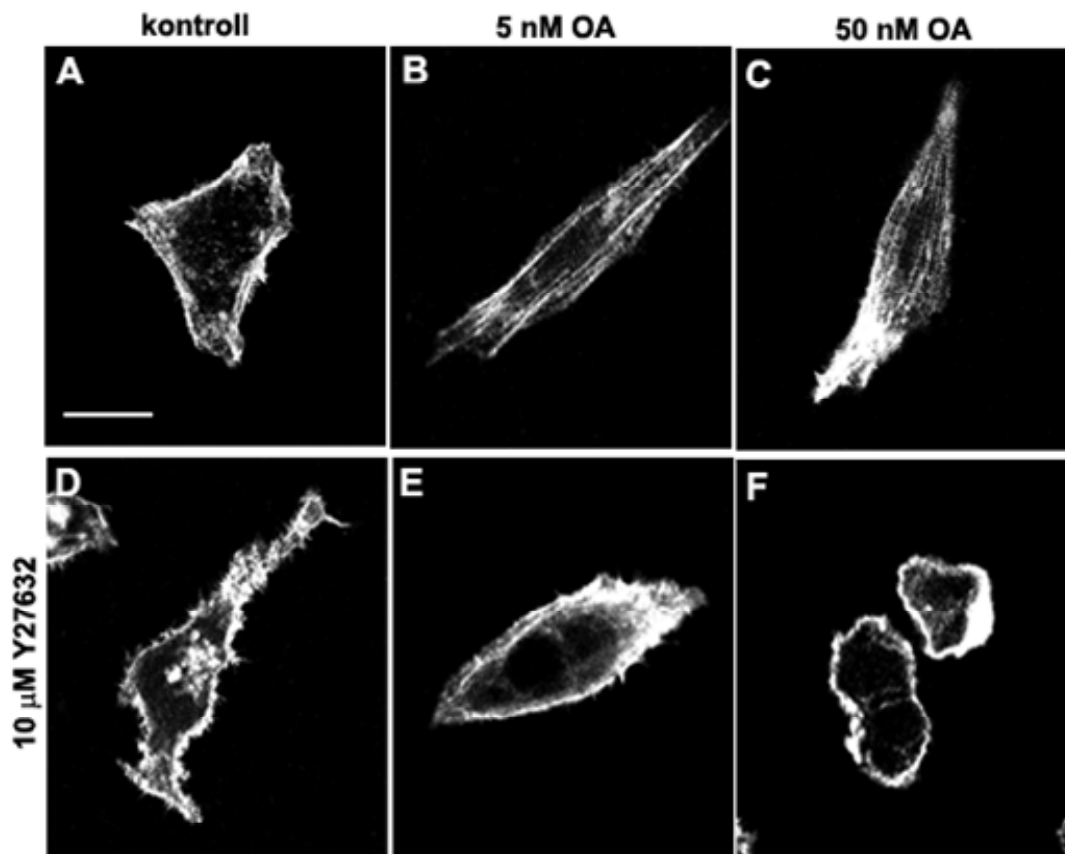
A 16-19. ábrák alapján valószínűsíthető, hogy a viszonylag alacsony OA koncentráció által indukált foszforilációs események- legalábbis részben- a PP2A gátlásának tulajdoníthatók. A ROK foszforilálhatja a MLC20-at és a MYPT1-et is, de mivel a MLC20^{Ser19} és MYPT1^{Thr696} foszforilációt az Y27632 csak részlegesen gátolja, ez más kináz(ok) részvételét is felveti ezekben a foszforilációs folyamatokban. Kimutatták, hogy COS7 sejtekben a ZIPK is szerepet játszhat az MLC20 foszforilációjában (Komatsu és Ikebe, 2004).

Tanulmányoztuk az OA hatását a ROK, PP2Ac és ZIPK lokalizációjára HepG2 sejtekben. A ROK citoplazmatikus eloszlást mutatott a kezeletlen HepG2 sejtekben (20A. ábra), míg 50 nM OA kezelést követően (20B. ábra) a ROK eloszlása megváltozott és megjelent a sejtmagban (gyenge festődést mutatva), valamint egy része a perinukleáris régióban koncentrált. A kontroll sejtekben a PP2Ac (20C. ábra) diffúz festődést mutatott a citoplazmában és homogén, de gyenge festődést a sejtmagban. 50 nM OA (20D. ábra) a PP2Ac festésének intenzitását növelte a sejtmagban, ezzel párhuzamosan kevésbé intenzív festődést mutatott a citoplazmában, ami a citoplazmatikus PP2Ac sejtmagba történő részleges transzlokációjára utal.

A ZIPK a kontroll HepG2 sejtekben citoplazmatikus eloszlást mutatott (20E. ábra) és nem változott 50 nM OA kezelés (20F. ábra) hatására sem.

Az OA és Y27632 hatása a stresszrostok képződésére

A miozin foszforilációja a sejtekben általában citoszkeletális változásokat indukál, amelynek egyik "indikátora" az aktinból és foszforilált miozinból álló stresszrostok megjelenése, illetve a stresszrostok intenzitásának (vastagságának) növekedése. További kísérleteinkben az OA és az Y27632 inhibitorok hatását vizsgáltuk a stresszrostok kialakulására HepG2 sejtekben F-aktin Alexa 633-konjugált falloidinnel történő festésével PFA fixálást követően. A kontroll sejtekben az F-aktin a kortikális régióban halmozódott fel (21A. ábra). 5 nM OA kezelés hatására vékony stresszkábelek alakultak ki (21B. ábra), amelyek 50 nM OA hatására intenzívebbé váltak (21C. ábra). 10 μ M Y27632 inhibitorral történő kezelést követően a HepG2 sejtek nagy százaléka sejtalakváltozáson ment át: lamellipodiumokat képeztek és abnormális sejtalakot vettek fel (21D. ábra). A sejteket Y27632 és OA inhibitorokkal kezelve az Y27632 kivédte az OA által indukált stresszrostok képződését (21E. és F. ábra).

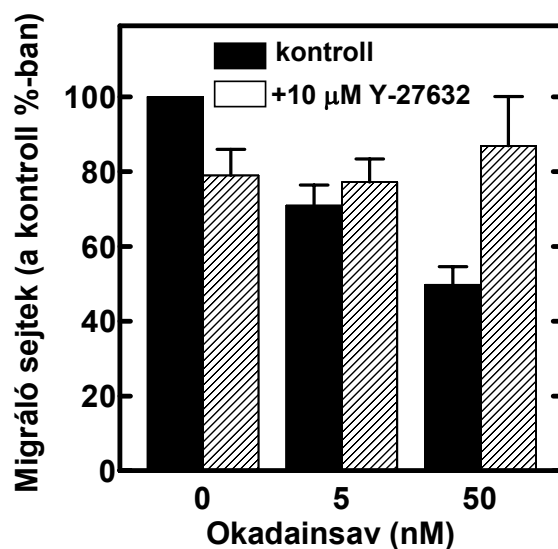


21. ábra Az OA és az Y27632 hatása az F-aktin eloszlására HepG2 sejtekben.

A sejteket a következő inhibitorok hozzáadásával inkubáltuk 60 percig: OA és Y27632 nélkül (A); 5 nM OA (B); 50 nM OA (C); 10 μ M Y27632 (D); 10 μ M Y27632 és 5 nM OA (E); 10 μ M Y27632 és 50 nM OA (F). A sejteket 4% PFA-val fixáltuk, permeabilizáltuk majd Alexa Fluor 633-konjugált falloidinna festettük, a felvételeket konfokális mikroszkóppal készítettünk. Méretarány: 10 μ m.

Az OA és Y27632 hatása a HepG2 sejtek migrációjára

A citoszkeletális változások, ezen belül a stresszrostok képződése és felbomlása befolyásolja a sejtek motilis sajátosságait. Az OA és az Y27632 hatására kiváltott sejtalakváltozás és stresszrost-képződés felveti annak lehetőségét, hogy ezek az inhibitorok a HepG2 sejtek motilis tulajdonságait is befolyásolhatják. A sejteket alacsony szérumszintű médiumban inkubáltuk Boyden kamrában 18 órán át OA és Y27632 nélkül, illetve azok jelenlétében. A sejtek migrációjának mértékére a fibronectinnel borított membránon áthaladt, fixált és festett sejtek lizátumának optikai denzitásából következtettünk. Az OA 5 nM illetve 50 nM koncentrációban alkalmazva 30 illetve 50 %-kal gátolta a kemoattraktánsok-által kiváltott sejtmigrációt (22. ábra). Az Y27632 (10 μ M) inhibitor önmagában csekély sejtmigrációs gátlást fejtett ki. Ezzel szemben az OA-val együtt alkalmazva kivédte az OA-által indukált sejtmigráció gátlását. Kontroll kísérletekben kimutattuk, hogy sem az OA, sem az Y27632



22. ábra Az OA és Y27632 hatása a HepG2 sejtek migrációjára.

A HepG2 sejtek migrációjának vizsgálatához kvantitatív sejtmigrációs analízisre alkalmas kit-et használtunk. Az ábrán jelzett OA koncentrációnál 10 µM Y27632 inhibitor nélkül (kitöltött oszlopok) vagy jelenlétében (csíkozott oszlopok) határoztuk meg a migrált sejtek optikai denzitását. 100%-nak az OA és Y27632 nélkül inkubált migrált sejtek festése után mért optikai denzitást tekintettük. Az értékek átlagok $\pm$ SE (n=4).

(az alkalmazott koncentrációban) nem befolyásolta a sejtek életképességét a 18 órás inkubálási idő alatt.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A miozin foszfatáz fiziológiai szerepének vizsgálata eddig nagyrészt a simaizom kontrakcióban betöltött szerepére irányult, amely folyamatban a miozin II 20 kDa könnyűláncának defoszforilációjával annak foszforilációs szintjét szabályozza. Érdekes felvetés azonban, hogy vajon a kontraktilitás szabályozása mellett ez az enzim milyen jelentőséggel bírhat olyan nem-izom jellegű szervekben/szövetekben, ahol a miozin foszforilációja és defoszforilációja szintén lejátszódhat, de szerepe kevésbé hangsúlyozott más sejtspecifikus funkciókhoz képest. A disszertációban az agy és májszövet eredetű sejteket (idegsejtek és hepatociták) tanulmányoztuk. Az agy sokrétű felépítésű és specializálódott funkciójú, összetettségét egyik szervrendszer sem múlja fölül a humán szervezetben. Ezen szövetre nem jellemző a citoszeletális változásokat is igénylő élénk proliferáció vagy sejtjárárlás, a citoszeletális elemek mégis fontosak lehetnek a szinaptikus plaszticitás során formálódó idegrendszerben vagy a neurotranszmittereket szállító vezikulák transzportjában. A májat anatómiailag és szövettanilag homogénebb szerekezet jellemzi, mint az agyat. A májsejtek egyszerű felépítésük ellenére szerteágazó funkciókat látnak el: integráló funkciójukkal a tápanyagok anyageseréjét alakítják, fenntartják a szervezet nitrogénegyensúlyát, a plazmafehérjék szintézisével fenntartják a homeosztázist, valamint a biotranszformációban is kulcsszerepet játszanak. A miozin foszfatáz, a MYPT1 szabályozó alegység, valamint a miozin II jelenlétét mind agy- és májszövetben kimutatták. Előzetes vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a miozin foszfatáz számos szubcelluláris kompartmenttel asszociál az idegsejtekben és a hepatocitákban is, ami arra utal, hogy az enzimnek feltehetően olyan szubsztrátja(i) is lehetnek, amelyek a kontraktilis sajátságoktól eltérő sejtfunkeiókban fontosak. Nem-izom sejtekben azonban nemcsak a miozin foszfatáz lehetséges új funkeióiról vannak hiányos ismereteink. Kevésbé tanulmányozták az enzim szerepét a sejtek motilitásának szabályozásában is, így pl. hepatokarcinóma sejtek (pl. a HepG2) migrációjában és inváziójában, amelyek a metasztázisok képződésének fontos elemei. A fentiek tükrében indokoltnak tűnt a miozin foszfatáz fiziológiai szerepének vizsgálata nem-izom sejtekben, ezért tanulmányoztuk a miozin foszfatáz lokalizációját, fehérjékkel való kölcsönhatását és a regulátor alegység (MYPT1) foszforilációjának szerepét az enzim szabályozásában idegsejtekben és HepG2 sejtekben.

A patkány agyban a MYPT1 és a MYPT2 izoformák is expresszálnak (Fujioka és mtsai., 1998), azonban a mindkét izoformára specifikus antitesttel kapott Western blot

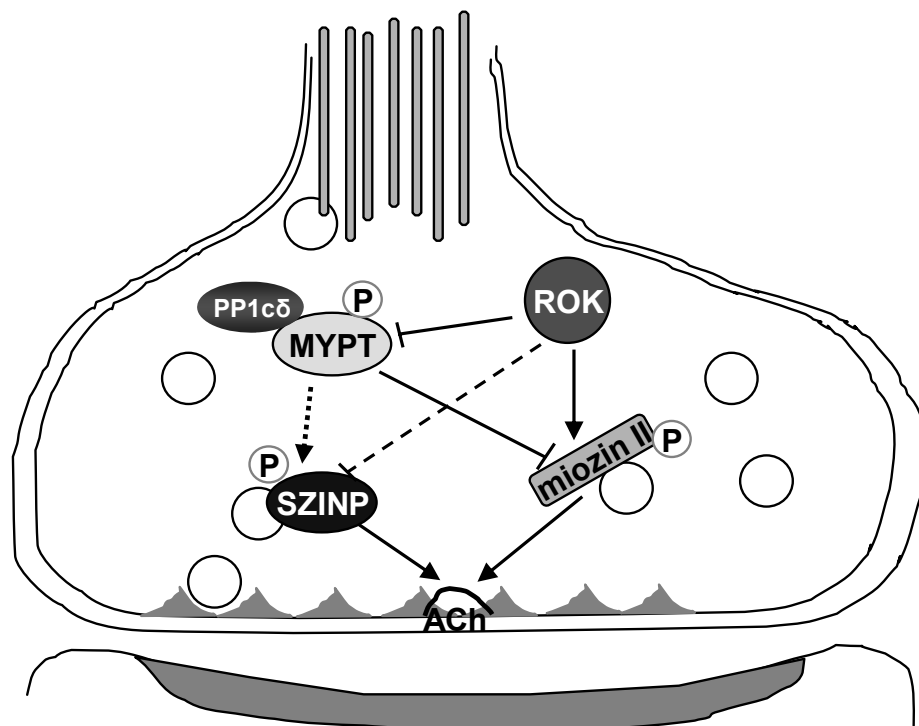
alapján (ld. 6. ábra) arra következtettünk, hogy a MYPT1 mennyisége jelentősen meghaladja a MYPT2 mennyiségét. Ezért részletesen a MYPT1 megoszlását és lokalizációját tanulmányoztuk. A MYPT1 koncentrációja a különböző agyrégiókban 30-78 nmol/g fehérje között változott, legnagyobb mennyiségben az agykéregben és a *striatum*ban detektáltuk, viszonylag alacsonyabb koncentrációban volt jelen a közép- és utóagyban. Ezen relatív mennyiségi változások fiziológiai jelentőségét, illetve a különböző mértékű expresszió molekuláris hátterét még nem ismerjük. A MYPT1 általunk meghatározott koncentrációja az agyban (30-78 nmol/g fehérje) hasonló más nem-izom sejtekben, így pl. C2C12 sejtekben becsült MYPT1 koncentráció (40-48 nmol/g összes fehérje) értékekhez (Wu és mtsai., 2003). A miozin foszfataz specifikus aktivitása (1,1-2,7 nmol/perc/mg) simaizom miozin szubsztráttal meghatározva a különböző agyrégiók lizátumaiban szintén összevethető a C2C12 sejtekben (~2,5 nmol/perc/mg) (Wu és mtsai., 2003), sőt a csirke zúza miofibrilláris extraktumban mért aktivitással (1,6 nmol/perc/mg) is (Alessi és mtsai., 1992). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a miozin foszfataz és a MYPT1 koncentrációja idegsejtekben hasonló a simaizom sejtekhez és más nem-izom sejtekhez. A foszfataz aktivitás és a MYPT1 koncentrációjának hasonló változása egyben arra is utal, hogy az enzim célra irányításában az idegsejtekben is alapvető szerepe lehet a MYPT1 alegységnek. Tekintettel arra azonban, hogy az idegsejtek specializálódott funkciót látnak el más sejtekhez viszonyítva, indokoltnak tűnt a miozin foszfataz és a MYPT1 régió- és szubcelluláris megoszlásának részletesebb vizsgálata is, immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia alkalmazásával, azzal a céllal, hogy az enzim lehetséges új funkcióira nyerjünk adatokat.

Eredményeink szerint a MYPT1 jelen van az agytörzsben, ahol a központi idegrendszer felső és alsó kompartmentjei közötti információcsere zajlik, valamint a limbikus rendszer részeiben, és az azt beidegző axonágakban is, ahol pedig az emocionális és ösztönös viselkedés szabályozása történik. A memória kialakulásában szintén szerepet játszhat a MYPT1, mivel kimutattuk az entorhinális agykéreg sejttestjeiben és a *hippocampus*ba futó idegpályákban is. A MYPT1 számos, de nem mindegyik idegsejt sejtmagjában és bizonyos idegsejtek magvacskájában is jelen van. A MYPT1 sejtmagi lokalizációját patkány aorta simaizom sejtekben korábban már kimutatták (Murata és mtsai., 1997), sejtmagi lokalizációját szintén valószínűsítik a MYPT1 N és C-terminális régiókban található sejtmagi lokalizációs szignál szekvenciák is. A MYPT1 lokalizációja a magvacskákban új megfigyelés. Megjegyzendő azonban, hogy a MYPT1 jelenlétét a magvacskákban csak a szöveti metszeteken észleltük, primer *hippocampus* és *nucleus cholearis* sejtekben a magvacskák nem mutattak MYPT1 festődést. A primer sejteken részleges eltérést

tapasztaltunk a sejtmagi lokalizációt tekintve is, a *hippocampus* sejt kultúrában a MYPT1-et a citoplazmában és a sejtmagban is detektáltuk, míg a *nucleus cochlearis* sejtekben a MYPT1 főleg citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a MYPT1 lokalizációját számos tényező befolyásolhatja, beleértve a sejtek fiziológiai állapotát, a sejtek korát és fejlődési stádiumát, a lokalizációs sajátosságok kimutatási lehetősége pedig gyakran függ az immunofluoreszcenciás detektálásra alkalmazott módszerektől és azok körülményeitől (fixálás módja és ideje) is. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a MYPT1 megoszlása az agyban, illetve az idegsejtekben nem homogén, hanem funkciójukat tekintve specializálódott régiókhoz, illetve sejten belül bizonyos kompartmentekhez kötött. Ez, a miozintól meglehetősen eltérő lokalizációs mintázat, a miozin foszfatáz általánosabb sejtfuncióit és a miozintól eltérő alternatív szubsztrátok jelenlétét is valószínűsíti, ezért feltételezhető, hogy idegsejtekben az enzim defoszforiláló aktivitásának célpontja a foszforilált miozin II-től eltérő szubsztrátok is lehetnek.

A simaizom miozin foszfatáz holoenzimben a MYPT1 szabályozó alegység a PP1c δ izoformával alkot komplexet (Alessi és mtsai., 1992). Az idegsejtek miozin foszfatáz holoenzimében a MYPT1-gyel asszociált fő PP1c izoforma feltehetően szintén a PP1c δ . Ezt támasztják alá azok az eredmények, amelyek szerint a MYPT1 általunk detektált megoszlása a különböző agyrégiókban hasonló a PP1c δ korábban kimutatott régióspecifikus eloszlásához (Strack és mtsai., 1999). Az idegsejtekben a PP1 δ -MYPT1 komplex jelenlétére utal az is, hogy az agyrégiók lizátumából vagy a szinaptoszómákból anti-MYPT1-gyel végzett immunprecipitáció, valamint GST-MYPT1-gyel végrehajtott pull-down kísérleteink során, a PP1c δ izoformát a MYPT1-gyel koprecipitálódó fehérjék között detektáltuk. Ennek ellenére a MYPT1 és PP1c δ (ld. 12A,D és G ábra) részben különböző lokalizációja primer idegsejtekben felveti a kérdést, hogy vajon a MYPT1 kizárólag a PP1c δ -val asszociálódhat-e. Az egyik lehetőség, hogy a MYPT1 szabadon van jelen a sejtekben, azaz a PP1c δ -MYPT1 komplex disszociál. Irodalmi adatok szerint ilyen holoenzim disszociáció játszódhat le PGF2 α -val stimulált portális vénában, amelynek során az agonista hatására a miozin holoenzim a MYPT1 gátló helyen (Thr695) történő foszforilációjával egyidejűleg a citoplazmából a membránhoz transzlokálódik, majd a PP1c δ disszociál a MYPT1-ről. A másik lehetőség, hogy a MYPT1 a PP1c δ -n kívül más PP1c izoformákkal is holoenzimet alkothat. Az utóbbit támasztja alá, hogy patkány aorta simaizomban kimutatták a MYPT1 kolokalizációját PP1c α izoformával is (Murata és mtsai., 1997). Eredményeink az idegsejtekben inkább ez utóbbi folyamat lehetőséget támasztják alá, mivel a MYPT1-gyel

agy kivonatból a PP1 α és/vagy PP1 γ alegységek is koprecipitálódtak (13B. ábra). Más neuronális PP1c-t kötő alegységek (neurofilament-L, a neurabin I vagy a neurabin II) preferenciáját a PP1 α és/vagy PP1 γ izoformák iránt már korábban kimutatták (MacMillan és mtsai., 1999; Terry-Lorenzo és mtsai., 2002). Eredményeink szerint a MYPT1 tehát az első olyan idegsejtekben azonosított PP1c szabályozó alegység, amely elsődlegesen a PP1c δ -val alkot holoenzimet. Az eddig idegrendszerben, illetve idegsejtekben leírt PP1 szabályozó alegységek (mint pl. a neurofilament-L, a neurabin I vagy a neurabin II) minde-



23. ábra A miozin foszfatáz feltételezhető szerepe a preszinapszisokban.

gyikét a posztszinaptikus denzitásokban mutatták ki (MacMillan és mtsai., 1999; Terry-Lorenzo és mtsai., 2002). Vizsgálataink során kimutattuk a MYPT1 és a PP1c δ alegységek jelenlétét a szinaptoszómákban, amely egyben viszonylag magas miozin foszfatáz aktivitással is párosult. A szinaptoszómákból elválasztott posztszinaptikus denzitásokban azonban mind a MYPT1 és a PP1c δ , valamint a miozin foszfatáz aktivitás is kevésbé kifejezett volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a miozin foszfatáz elsősorban a preszinapszisokban lokalizálódik. Ezzel összhangban, primer idegsejtekben kimutattuk mind a MYPT1 és a PP1c δ kolokalizációját szinaptofizinnel, amely preszinaptikus marker fehérjeként és szinaptikus

vezikulák integráns membrán fehérjéjeként is ismert. A szinaptofizin immunprecipitáció és pull-down kísérletek során is koprecipitálódott a MYPT1-gyel, amiből arra következtetünk, hogy a miozin foszfatáz holoenzim és a szinaptofizin kölcsönhatásáért a MYPT1 felelős. A szinaptofizin foszfofehérje. A CaMK-II foszforilálja (Rubenstein és mtsai., 1993) és foszforilációja szabályozza az acetilkolin (ACh) kibocsátását a szinaptoszómákból (Asermely és mtsai., 1999). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a szinaptofizin a miozin foszfatáz szubsztrátja lehet és a MYPT1 a katalitikus alegység célra irányításában játszhat szerepet. Érdekes, hogy a miozin II is jelen van a preszinapszisokban és a preszinaptikus membránban is lokalizálódhat, ahol foszforilációja és kölcsönhatása az aktinnal a szinaptikus transzmisszió és a neurotranszmitter kibocsátás előfeltétele (Mochida és mtsai., 1994). A miozin foszforilációja befolyásolja a szinaptikus vezikulák aktív zónába szállítását és a szinaptikus vezikulák kialakulását (Kumakura és mtsai., 1994). Hipotézisünk szerint (23. ábra) a miozin II mellett a miozin foszfatáz szubsztrátja lehet a szinaptofizin is, ezáltal az enzim az idegsejtekben szerepet játszhat a vezikulák szállításában és a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában.

A mechanizmus további résztvevője lehet a ROK is. Korábban kimutatták, hogy a miozin foszfatáz a RhoA/ROK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódhat (Somlyó és Somlyó, 2000). A ROK a MYPT1-t a gátló helyen (Thr695 oldalláncon) foszforilálja (Feng és mtsai., 1999b) és ezzel gátolja a miozin foszfatáz aktivitását. Idegszövetben a ROK jelenlétét korábban már kimutatták és lokalizációs mintázatát is tanulmányozták (Hashimoto és mtsai., 1999). A ROK fontos szerepet játszik az axon növekedési irányának meghatározásában (Bito és mtsai., 2000) és a növekedési kúp megszűnésében (Arimura és mtsai., 2000). Kísérleteinkben igazoltuk a ROK jelenlétét és kölcsönhatását a MYPT1-gyel agy lizátumban és a szinaptoszómákban is. A ROK számos fehérjét foszforilál, így pl. a: miozin II-t (Hartshorne és mtsai., 1998); az adducin-t (Kimura és mtsai., 1998); a moezin-t (Fukata és mtsai., 1998); a MAP2 és a Tau (Amano és mtsai., 2003) fehérjéket. Ezek mindegyikét a miozin foszfatáz szubsztrátjaként is azonosították és igazolták kölcsönhatásukat a MYPT1-gyel. Az idegrendszerben például a moezin foszforilációja a patkányokban elektrokonvulzív shock során megemelkedett (Jeon és mtsai., 2002), míg a MAP2 és Tau foszforilációja/defoszforilációja a ROK/miozin foszfatáz által a mikrotubulus dinamizmusát szabályozhatja. A fenti adatok azt jelzik, hogy a miozin foszfatáz és a ROK összehangolt hatása szabályozhatja az ismert és eddig még azonosítatlan neuronális fehérjék foszforilációs szintjét is. A fenti sémán bemutatott hipotézis része, hogy a ROK szerepet játszhat a szinaptofizin foszforilációjában, és ezzel a vezikulák szállítását és a

neurotranszmitter felszabadulását is szabályozhatja. E mechanizmus kísérletes megerősítését további munkánk során tervezzük.

Az idegszövet mellett a miozin foszfatáz szabályozó szerepét tanulmányoztuk humán hepatokarcinóma (HepG2) sejtvonalban. Kimutattuk, hogy a miozin foszfatáz eltérő mennyiségben van jelen a HepG2 sejt szubcelluláris frakcióiban. Az intakt miozinnal meghatározott foszfatáz aktivitás a Western blottal meghatározott MYPT1 mennyiségének arányában oszlott meg (*ld. 15A. ábra*), így feltehető, hogy a miozin foszfatáz a MYPT1 alegység irányítja az adott szubcelluláris kompartmentekbe. Nyugalomban lévő humán trombocita szubcelluláris frakciók közül a miozin foszfatáz aktivitás és a MYPT1 elsősorban a citoszkeletonban és a membrán frakcióban volt jelen és viszonylag alacsony mennyiségben a citoszolikus frakcióban (Murányi és mtsai., 1998). HepG2 sejtekben a miozin foszfatáz és a MYPT1 nagyobb koncentrációban volt jelen a sejtmagi, citoszkeleton és a mikroszóma/mitokondrium frakciókban a citoszolikus és plazmamembrán frakciókhoz képest (*ld. 15B. ábra*). Elvégeztük a humán MYPT1 szekvencia analízisét PSORTII programmal és elemeztük a MYPT1 jelenlétének valószínűségét a különböző szubcelluláris kompartmentekben. Az így kapott eredmények alapján a MYPT1 a sejtmagban 65%, míg a mitokondrium/mikroszóma frakcióban 17%-os valószínűséggel lehet jelen. Sejtmagbeli lokalizációjára és funkciójára utalhat az is, hogy a MYPT1-ben számos sejtmagi lokalizációs szignál azonosítható, valamint a humán MYPT1 DNS kötése képes leucin cipzár motívumot is tartalmaz. A MYPT1 sejtmagi lokalizációját immunofluoreszciás vizsgálattal bizonyítottuk MYPT1-re specifikus antitestet használva (*ld. 16. ábra*). Az idegsejtekben tapasztalható diffúz festődéssel ellentétben a HepG2 sejtek sejtmagjában jól körülhatárolt foltokban volt jelen a MYPT1, ami igazolja a MYPT1 elsődlegesen sejtmagi lokalizációját és feltételezett kölcsönhatását a sejtmagi struktúrákkal. A miozin foszfatáz ismert szubsztrátjait és kölcsönható fehérjeit (pl.: miozin-II, adducin, stb) eddig nem mutatták ki a mitokondrium/mikroszóma frakcióban és a sejtmagban, de ez utóbbi tekintetében az ezrin, a moezin és a radixin mint lehetséges partner szóba jöhet (Batchelor és mtsai., 2004). Ezen adatok a miozin foszfatáz új funkcióira utalhatnak a mikroszómális/mitokondriális és sejtmagi foszforfehérjék defoszforilálásában, de a pontos célpontok jelenleg még ismeretlenek.

A MYPT1 HepG2 sejteken belüli lokalizációjának tanulmányozása konfokális mikroszkóppal részben megerősítette a szubcelluláris frakciók vizsgálatával kapott eredményeket: a MYPT1-et a kezeletlen sejtekben a citoplazmában és a sejtmagban azonosítottuk MYPT1-re specifikus antitesttel. A sejtek foszfatáz inhibitorral (OA) történő

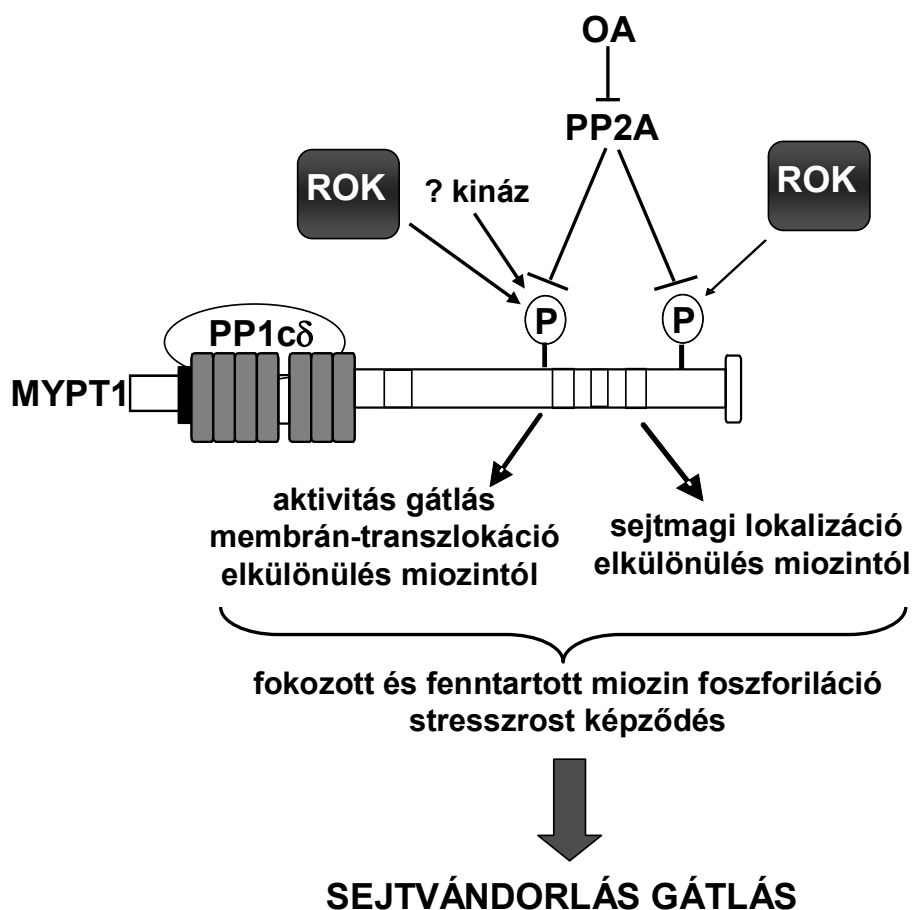
kezelése a citoplazmatikus MYPT1 transzlokációját eredményezte a plazmamembránba. Mivel az OA általános hatása az intracelluláris fehérjék foszforilációs szintjének növelése, ezért indokoltnak tűnt annak vizsgálata, hogy vajon az MLC20 és a MYPT foszforilációs szintjében van-e változás. HepG2 sejtekben az OA növelte a MLC20 foszforilációját Ser19 oldalláncon, valamint a MYPT1 foszforilációjának mértékét a Thr695 és a Thr850 oldalláncokon (*ld. 17. és 18. ábra*). Az MLC20 foszforilációjának növekedése a MLC20^{pS19} koncentrációját eredményezte a sejt centrális régiójában. A MYPT1 két foszforilációs helye lokalizációtól függő szelektív foszforilációt mutat, azaz a Thr695 foszforilált MYPT1 (MYPT1^{pThr695}) elsősorban a plazmamembránban, a Thr850 foszforilált MYPT1 (MYPT1^{pThr850}) pedig a sejtmagban és a perinukleáris régióban koncentrált.

Az OA által kiváltott MYPT1 transzlokációban a Thr695 oldallánc foszforilációja, és ebben a ROK szerepe még nem tisztázott. A HepG2 sejtekben az OA kezelést megelőzően a MYPT1^{pThr695} citoplazmatikus lokalizációt mutatott. A ROK-ra specifikus Y27632 inhibitor csak kismértékben gátolta a MYPT1 foszforilációját a Thr695 oldalláncon, így feltehető, hogy a ROK-tól eltérő kináz(ok) játszhatnak szerepet a Thr695 foszforilációjában. Emellett az OA és Y27632 együttes jelenléte a MYPT1^{pThr695} részleges plazmamembránból citoszolba történő visszarendeződését okozta, ami kérdéssé teszi egy domináns ROK-függő útvonal szerepét. A ROK kezeletlen HepG2 sejtekben citoplazmatikus festődést mutatott, de OA kezelést követően részleges transzlokációja figyelhető meg a sejtmagba és a perinukleáris régióba (*ld. 20. ábra*). Hipotézisünk tehát az, hogy a ROK-tól eltérő, ismert (pl. ILK) vagy eddig még nem azonosított citoplazmatikus MYPT1 kináz(ok) vehetnek részt a Thr695 oldallánc foszforilációjában. Alternatív lehetőségekként merül fel, hogy a MYPT1 defoszforilált formában, esetleg membránhoz irányító más fehérjé(kkel) komplexet alkotva transzlokálódik a plazmamembránba, és ott membránhoz-kötött kináz(ok) foszforilálják. Ez utóbbi mechanizmusban nem zárható ki az sem, hogy az OA a MYPT1 (akár foszforilált vagy defoszforilált) membrán transzlokációját elősegítő fehérjék foszforilációját is szabályozza.

Felmerül a kérdés, hogy vajon melyek a HepG2 sejtekben OA hatására megemelkedett MLC20 foszforilációjában szerepet játszó kináz(ok). A miozin II foszforilációjában az MLCK játszik fontos szerepet és feltehető, hogy az OA kezelés hatására az MLCK alapaktivitás megemelkedik, és ez a MLC20 foszforilációs szintjének növekedéséhez vezet. A foszfatázgátló toxinok azonban nem növelik az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt (Kurisaki és mtsai., 1993), ezért az MLCK szerepe az OA-indukált MLC20 foszforilációban kevésbé lehet jelentős. Eredményeink arra utalnak, hogy a ROK szintén

szerepet játszik ebben a folyamatban, bár más miozin kinázok jelenléte is feltételezhető. A ZIPK jelentőségét az MLC20 foszforilációjában COS7 sejtekben bizonyították (Komatsu és mtsai., 2004). HepG2 sejtekben a ZIPK citoplazmatikus lokalizációt mutatott OA hiányában és jelenlétében is (*ld. 20. ábra*), amelyek alapján részvétele az MLC20 foszforilációjában feltételezhető.

Az OA kezelés által kiváltott folyamatokban nemcsak a kinázok, hanem az érintett foszfatázok szerepét is vizsgáltuk. Kísérleteinkben az OA-t viszonylag alacsony (50 nM) koncentrációban alkalmaztuk. Irodalmi adatok szerint az OA még 1 μ M koncentrációban sem gátolta a PP1 enzimeket (Favre és mtsai., 1997). Ezzel összhangban, HepG2 lizátumban az OA csak 100 nM koncentráció felett gátolta a PP1 enzimeket (köztük a miozin foszfatázt),



24. ábra Az OA hatása a MYPT1 szabályozására HepG2 sejtekben.

viszont a PP2A gátlása már alacsonyabb koncentrációknál (10-100 nM) megfigyelhető volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az OA a PP2A gátlásán keresztül fejt ki hatását. *In vitro* vizsgálatok szerint a MYPT1 két ROK által foszforilált helye közül a PP2A képes

defoszforilálni a foszforilált Thr850 oldalláncot, de csak kismértékben hat a foszforilált Thr695-ra (Takizawa és mtsai., 2002b). Mivel az Y27632 gátolta az OA-által kiváltott foszforilációt a Thr850-on, feltételezhető, hogy ezen az oldalláncon a reverzibilis foszforilációt a ROK és PP2A szabályozza. Ezt támasztja alá az is, hogy a PP2A és ROK eloszlása az OA-val kezelt HepG2 sejtekben hasonló volt, azaz mind a MYPT1^{pThr850} és a PP2A a sejtmagban és a perinukleáris régióban is koncentrált.

Korábban kimutatták, hogy a miozin foszfatáz gátlása, pl. MYPT1 specifikus antitest sejtekbe történő injektálásával, önmagában is stresszrostok képződését (Totsukawa és mtsai., 1999) és a sejtmigráció gátlását (Totsukawa és mtsai., 2004) eredményezi. Eredményeink szerint a sejtek OA-val történő kezelése hasonló citoskeletális és motilitásbeli változásokat okozhat. Az OA kezelés hatására kiváltott MLC20 foszforilációjának növekedése egyértelműen a miozin foszfatáz gátlására utal, de eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez a gátlás közvetetten, a PP2A és az OA kölcsönhatása által valósul meg. Ennek a közvetett hatásnak számos oka lehet: (a) a MYPT1 foszforilációja a Thr695 gátló foszforilációs helyen (Feng és mtsai., 1999); (b) a MYPT1 foszforilációja a Thr850 foszforilációs helyen, ami csökkenti a miozin foszfatáz affinitását a miozinhoz (Velasco és mtsai., 2002); (c) a MYPT1 transzlokációja a membránhoz, ami a miozin II-től való térbeli elkülönülést okozza és elősegítheti a foszfatáz gátlását foszfolipidek által (Ito és mtsai., 1997), valamint a foszfolipidek a foszforilált MYPT1 defoszforilációját is gátolhatják (Takizawa és mtsai., 2002b). Eredményeink szerint az OA növeli a miozin II foszforilációs szintjét és a miozin II lokalizációját a HepG2 sejtek központi részében. Az OA kezelés stresszrostok kialakulását is indukálta, amelyek képződését viszont a ROK inhibitor (Y27632) teljesen gátolta. Az OA gátolta a HepG2 sejtek migrációját is, amely azonban Y27632 jelenlétében nem volt megfigyelhető. Tehát a ROK aktivitása és a miozin foszfatáz gátlása is szükséges a miozin II megnövekedett foszforilációjához, a stresszrostok kialakulásához. és a migráció gátlásához (24. ábra). A miozin foszfatáz gátlása szintén csökkentette a sejtek migrációját (Totsukawa és mtsai., 2004), és ez megegyezik a feltételezett OA-indukált miozin foszfatáz gátlásával HepG2 sejtekben. Ismeretes, hogy a sejtek migrációjában a miozin II foszforilációja a sejtesttest kontrakciójában és a sejt hátsó ("farki") részének felválásában van szerepe (Totsukawa és mtsai., 2004; Ridley AJ., 2004). A folyamatos vándorlás feltétele a stresszrostok és fokális adhéziók dinamikus újraképződése és felbomlása. Az egyik feltételezett mechanizmus, hogy a miozin foszfatáz gátlása a miozin II foszforiláció fenntartását segíti elő, és mintegy rögzítve a stresszrostokat és fokális adhéziókat, azok lassúbb „turnover-ét” eredményezi. Ez stabilabb adhéziós szerkezetekben és ezzel lassúbb migrációban nyilvánul meg.

Az általunk tanulmányozott mechanizmus új eleme, hogy ez a migrációs gátlás alacsony koncentrációjú, a PP2A gátlását okozó OA jelenlétében is megfigyelhető. Ez a felismerés azzal egészíti ki az eddig ismert ROK és miozin foszfatáz függő folyamatot, hogy bizonyos körülmények mellett a PP2A is szerepet játszhat a sejtek motilitásának szabályozásában. Ezek az adatok tehát hozzájárulhatnak a sejt migráció farmakológiai befolyásolását célzó kutatásokhoz is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegységből (PP1c) és 130/133 kDa miozin kötő (célra irányító) alegységből (MYPT1) áll. Elsődleges funkciója a miozin-II 20 kDa könnyűláncának (MLC20) defoszforilációja, és ezzel fontos szerepet játszik a simaizom és nem-izom sejtek kontrakciójának és motilitásának szabályozásában. A MP aktivitását a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncának Rho-asszociált kináz (ROK) általi foszforilációja szabályozza. A MP a miozinon kívül más fehérjéket is defoszforilál, azonban lokalizációja, valamint a kontraktilitáson kívül más sejtfolyamatokban játszott szabályozó szerepe nem-izom sejtekben és szövetekben kevésbé ismert.

Eredményeink szerint a MP és a MYPT1 jelen van agyszövetben és humán hepatokarcinóma sejtekben (HepG2) is. Az MP aktivitása és a MYPT1 mennyisége hasonló régió- és szubcelluláris megoszlást mutat, amely a MYPT1 célra irányító funkciójára utal az idegsejtekben és a HepG2 sejtekben is. A MP és a MYPT1 az agyban valamennyi agyrégióban kimutatható, de koncentrációja specifikus magcsoportokhoz az idegsejtekre specifikus fiziológiai funkciókat sejtet. A MP-t kimutattuk az agykéregből izolált szinaptoszómák preszinaptikus frakciójában, és igazoltuk kölcsönhatását a szinaptofizin fehérjével, ROK-kal és a PP1cδ izoformával. A MP tehát szerepet játszhat a szinapszisok vezikuláris transzportjában és a neurotranszmitterek kibocsátásában a szinaptikus részbe.

A HepG2 sejtek kezelése foszfatázinhibitor okadainsavval (OA) a protein foszfatáz 2A (PP2A) enzim gátlását eredményezve szabályozza az MLC20 és a MYPT1 foszforilációs szintjét. Az OA a MYPT1 citoplazmából plazmamembránba történő transzlokációját okozta és növelte a MYPT1 foszforilációját a gátló Thr695 oldalláncon. Ezen hatásokat a ROK inhibitor Y27632 kevésbé befolyásolta. Az OA növelte a MYPT1 foszforilációját a Thr850 oldalláncon (MYPT1^{pThr850}), amelyet Y27632 nagymértékben gátolt. A MYPT1^{pThr850} a sejtmagban és a perinukleáris régióban volt jelen. Az OA kezelés a MLC20 Ser19 foszforilációját és a foszforilált miozin-II-nek a sejtek centrális részén való koncentrációját indukálta, amelyet az Y27632 részlegesen gátolt. HepG2 sejtekben az OA hatására stresszrostok képződtek és csökkent a sejtek migrációs készsége, de e változások a ROK inhibitor jelenlétében nem figyelhetők meg. Következtetésünk az, hogy az OA PP2A- és részben ROK-függő módon a MYPT1 szelektív foszforilációját és transzlokációját indukálja, ami a miozin defoszforilációjának gátlásával párosul. Ezek a hatások a miozin fenntartott foszforilációját eredményezve szabályozzák a sejtek motilis sajátosságait.

SUMMARY

The myosin phosphatase holoenzyme (MP) consists of protein phosphatase 1 (PP1) catalytic subunit (PP1c) and 130/133 kDa myosin binding (targeting) subunit termed myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1). The MP primarily dephosphorylates the 20 kDa subunit of myosin-II (MLC20), thereby regulates the contractility and motility of smooth muscle and non-muscle cells. The activity of MP is mediated via phosphorylation of MYPT1 on Thr695 and Thr850 by RhoA-associated protein kinase (ROK). The MP also dephosphorylates substrates distinct from myosin; however, its localization and function in cellular processes, other than contractility, of non-muscle cells and tissues, is less understood.

Our results show that MP and MYPT1 are present in brain and in human hepatoma (HepG2) cells. The activity of MP and the amount of MYPT1 exhibited similar regional- and subcellular distribution suggesting a targeting function for MYPT1 in both neuronal and HepG2 cells. The MP and MYPT1 are identified in all regions of brain, but within the regions MYPT1 accumulated in certain groups of neurons and axon bundles suggesting its involvement in specialized neuronal functions. MP and MYPT1 were identified in the presynaptic fraction of synaptosomes isolated from cerebral cortex, and interaction of MYPT1 with synaptophysin, ROK and PP1c δ was established. These data suggest that MP may be involved in the regulation of the transport of synaptic vesicles and in the release of neurotransmitters into the synaptic clefts.

We have shown that the treatment of HepG2 cells with okadaic acid (OA) resulted in inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A) that accompanied with the regulation of the phosphorylation level of MLC20 and MYPT1. OA induced the translocation of MYPT1 from the cytoplasm to the plasmamembrane and increased the phosphorylation of MYPT1 on Thr695, which causes inhibition of MP activity. These effects were slightly influenced by Y27632, a specific ROK inhibitor. OA increased the phosphorylation of MYPT1 on Thr850 (MYPT1^{pThr850}), which was profoundly inhibited by Y27632. MYPT1^{pThr850} was localized in the nucleus and at the perinuclear regions in HepG2 cells. On treatment with OA the increased phosphorylation of MLC20 on Ser19 was observed and it was associated with the appearance of myosin-II at the cell center. OA induced stress fiber formation and a decrease in cell migration, but both of these OA-induced effects were blocked by Y27632. It is concluded that OA induces differential phosphorylation and translocation of MYPT1 in a PP2A- and to varying extent in a ROK-dependent manner resulting in inhibition of myosin

dephosphorylation. these changes are associated with an increased and sustained level of myosin-II phosphorylation and attenuation of motile features of the HepG2 cells.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P (1992) The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**: 5063-5068.
- Alessi DR, Street AJ, Cohen P, Chen PTW (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**: 1055-1066.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp. Cell Res.* **261**: 44-51.
- Amano M, Kaneko T, Maeda A, Nakayama M, Ito M, Yamauchi T, Goto H, Fukata Y, Oshiro N, Shinohara A, Iwamatsu A, Kaibuchi K (2003) Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J. Neurochem.* **87**: 780-790.
- Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 5699-5704.
- Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T (2001) Arachidonic acid-induced Ca^{2+} sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch.* **441**: 596-603.
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J. Biol. Chem.* **275**: 23973-23980.
- Armstrong, CG, Browne GJ, Cohen, P, Cohen PTW (1997) PP/R6, a novel member of the family of glycogen-targeting subunits of protein phosphatases 1. *FEBS Lett.* **418**: 210-214.
- Asermely KE, Sterling GH, McCafferty MR, O'Neill JJ (1999) Synaptophysin is phosphorylated in rat cortical synaptosomes treated with botulinum toxin A. *Life Sci.* **64**: PL297-303.

- Bannert N, Vollhardt K, Asomuddinov B, Haag M, König H, Norley S, Kurth S (2003) PDZ Domain-mediated interaction of interleukin-16 precursor proteins with myosin phosphatase targeting subunits. *J. Biol. Chem.* **278**: 42190-42199.
- Barnes GN, Slevin JT, Vanaman TC (1995) Rat brain protein phosphatase 2A: an enzyme that may regulate autophosphorylated protein kinases. *J. Neurochem.* **64**: 340-353.
- Barton GJ, Cohen PT, Barford D (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **220**: 225-37.
- Batchelor CL, Woodward AM, Crouch DH (2004) Nuclear ERM (ezrin, radixin, Moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. *Exp. Cell Res.* **296**: 208-222.
- Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron.* **26**: 431-41.
- 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**: 3053-3059.
- Cao W, Mattagajhasinh SN, Xu H, Kim K, Fierlbeck W, Deng J, Lowenstein CJ, Ballermann BJ (2002) TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF- β 1 and expressed in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**: C327-C337.
- Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell. Biol.* **86**: 831-45.
- Cerulemans H, Stalmans W, Bollen M (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eucaryotic evolution *Bioessays* **24**: 371-381.
- Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* **84**: 1-39.
- Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2001) Evolutionary kinship between vertebrate regulators of PP1. EMBO Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. Marburg, Germany.

- Chen YM, Chen MX, Alessi DR, 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**: 51-55.
- Cohen PTW (1988) Two isoform of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene *FEBS Lett.* **232**: 17-23.
- Cohen P. (1989): The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 453-508.
- Cohen PTW (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 245-51.
- Cohen PTW (2002) Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J. Cell Sci.* **115**: 241-256.
- 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.
- Diaz-Guerra MD, Junco M, Bosca L (1991) Oleic acid promotes changes in the subcellular distribution of protein kinase C in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **271**: 23568-23576.
- Doherty MJ, Moorhead G, Morrice N, Cohen P, Cohen PTW (1995) Amino acid sequence and expression of the hepatic glycogen binding (GL) subunit of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* **399**: 339-343.
- Dombrádi V. Axton JM, Brewis ND, da Cruz e SilvaEF, Alphey L, Cohen PTW (1990) Drosophila contains three different genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1 *Eur. J. Biochem.* **194**: 739-745.
- Dombrádi V. (1997) Comparative analysis of Ser/Thr protein phosphatases. *Trend Comparative Biochem. Physiol.* **3**: 23-48.
- Dubois T, Howell S, Zemlickova E, Learmouth M, Cronshaw A, Aitken A. (2003) Novel in vitro and in vivo phosphorylation site on protein phosphatase-1 inhibitor CPI-17. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 186-192.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569.

- Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P, Barford D (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **254**: 942-59.
- Egloff MP, Johnson F, Moorhead G, Cohen PTW, Cohen P, Barford D (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* **16**: 1876-1887.
- 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**: 5220-5228.
- Erdodi F, Kiss E, Walsh MP, Stefansson B, Deng JT, Eto M, Brautigan DL, Hartshorne DJ. (2003) Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**: 382-7.
- Erdodi F, Toth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P (1995) Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *Am. J. Physiol.* **269**: C1176-84.
- Eto M, Karginov A, Brautigan DL (1999) A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry* **38**: 16952-16957.
- Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F (1995) A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J. Biochem.* **118**: 1104-1107.
- Favre B, Turowski P, Hemmings BA (1997) Differential Inhibition and Posttranslational Modification of Protein Phosphatase 1 and 2A in MCF7 Cells Treated with Calyculin-A, Okadaic Acid, and Tautomycin. *J. Biol. Chem.* **272**: 13856-13863.
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T. (1999b) 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, Nakano T (1999a) Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **274**: 3744-3752.

- Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakumara M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, 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. *J. Cell Biol.* **141**: 409-18.
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J (1995) Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine-threonine phosphatase-1. *Nature* **376**: 745-753.
- Gong MC, Fuglsang A, Alessi D, Kobayashi S, Cohen P, Somlyo AV, Somlyo AP (1992) Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcineurin. *J. Biol. Chem.* **267**: 21492-21498.
- Hamaguchi T, Ito M, Feng J, Seko T, Koyama M, Machida H, Takase K, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**: 825-830.
- Harlow E és Lane D (1988) Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. (2004) Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* **279**: 37211-4.
- Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F (1998) Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**: 325-341.
- Hashimoto R, Nakamura Y, Kosako H, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M, Takeda M (1999) Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 575-9.
- Hayashi Y, Senba S, Yazawa M, Brautigan DL, Eto M. (2001) Defining the structural determinants and a potential mechanism for inhibition of myosin phosphatase by protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa. *J. Biol. Chem.* **276**: 39828-39863.
- Hirano K, Phan BC, Hartshorne DJ (1997) Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**: 3683-3688.

- Hubbard MJ és Cohen P (1989) Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle 2. Phosphorylation of cAMP dependent protein kinase at site 2 releases catalytic subunit from the glycogen-bound holoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **186**: 701-709.
- Hunter T (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Ying and Yang of Protein Phosphorylation and Signalling. *Cell* 80: 225-236.
- 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**: 7607-7614.
- Ito M, Nakano T, Erdődi F, Hartshorne DJ (2004) Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. *Mol. Cell Biochem.* **259**: 197-209.
- Jagiello I, Van Eynde A, Buellens M, Vulsteke V, Boudrez A, Keppens S, Stalmans W, Bollen M (1997) NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1 has RNA-binding properties. *J. Biol. Chem.* **272**: 22067-22071
- Jeon S, Kim S, Park JB, Suh PG, Kim YS, Bae CD, Park J (2002) RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J. Biol. Chem.* **277**: 16576-16584.
- Johnson D, Cohen P, Chen MX, Chen YH, Cohen PTW (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**: 931-939.
- Kamibayashi C és Mumby MC (1995) *Adv. Prot. Phosphatases* **9**: 195-210.
- Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, 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, Fisher 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**: 5542-5548.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara N, Fukata Y, Nakafuru M, Yamamori B, Feng J, Nakano J, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**: 1583-1587.

- Kiss E, Muranyi A, Csontos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F (2002) Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem. J.* **365**: 79-87.
- Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, 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.
- Komatsu S és Ikebe M (2004) ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J. Cell Biol.* **165**: 243–254.
- Koyama M, Ito M, Fenh J, Seko T, Shikari K, Takase K, Hartshorne DJ, Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho kinase. *FEBS Lett.* **475**: 197-200.
- Kreegipuu A, Blom N, Brunak S, Jarv J (1998) Statistical analysis of protein kinase specificity determinans. *FEBS Lett.* **430**: 45-50.
- Kumakura K, Sasaki K, Sakurai T, Ohara-Imaizumi M, Misonou H, Nakamura S, Matsuda Y, Nonomura Y (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* **14**: 7695-703.
- Kurisasi T, Magae J, Nagai K, Hirata A, Kusaka I, Shinji H, Morikawa M, Yoshida T, Isono K, Yamasaki M (1993) Morphological changes and reorganization of actin filaments in human myeloid leukemia cells induced by a novel protein phosphatase inhibitor, tautomycin. *Cell. Struct. Funct.* **18**: 33-9.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Liau S és Steinberg RA (1996) Dephosphorylation of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase at Thr-197 by a cellular protein phosphatase and by purified protein phosphatase-2A. *J. Biol. Chem.* **273**: 7038-7043.
- Liu QR, Zhang PW, Zhen Q, Walther D, Wang XB, Uhl GR. (2002) KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J. Biol. Chem.* **277**: 13312-13320.

- Lontay B, Serfozo Z, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F (2004) Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J. Comp. Neurol.* **478**: 72-87.
- MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigan DL, Haystead TA. (2001) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett.* **493**: 91-94.
- MacDonald JA, Eto M, Murányi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TA (2001) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**: 2419-24.
- MacKintosh C, Garton AJ, Barford D, Cohen PTW, Cohen P and Tonks NK (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Lett.* **397**: 235-238.
- MacMillan LB, Bass MA, Cheng N, Howard EF, Tamura M, Strack S, Wadzinski BE, Colbran RJ (1999) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J. Biol. Chem.* **274**: 35845-54.
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings B (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *TIBS* **24**: 186-191.
- Mochida S, Kobayashi H, Matsuda Y, Yuda Y, Muramoto K, Nonomura Y. (1994) Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. *Neuron* **13**: 1131-42.
- Murányi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, Erdődi F, Kiss E, Wu Y, Hartshorne DJ (2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem. J.* **366**: 211-216.
- Murányi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF, Hartshorne DJ (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett.* **493**: 80-84.
- Murata K, Hirano K, Villa-Moruzzi E, Hartshorne DJ, Brautigan DL (1997) Differential localization of myosin and myosin phosphatase subunits in smooth muscle cells and migrating fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **4**: 663-673.

- Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhoul GM. (2003) Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**: G1006-16.
- 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**: 671-676.
- Niiró N és Ikebe M (2001) Zipper-interacting Protein Kinase Induces Ca^{2+} -free Smooth Muscle Contraction via Myosin Light Chain Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 29657-29574.
- Pato MD és Kerc E (1986) Limited proteolytic digestion and dissociation of smooth muscle phosphatase-I modifies its substrate specificity. Preparation and properties of different forms of smooth muscle phosphatase-I. *J. Biol. Chem.* **261**: 3770-3774.
- Phung TL, Roncone A, L de Mesy Jensen K, Sparks CE, Sparks JD (1997) Phosphoinositide 3-Kinase Activity Is Necessary for Insulin-dependent Inhibition of Apolipoprotein B Secretion by Rat Hepatocytes and Localizes to the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **272**: 30693-30702.
- Ricciarelli R és Azzi A (1998) Regulation of recombinant PKC α activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**: 197-200.
- Ridley, A.J. (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**: 2713–2722.
- Roberts TG, Sturm NR, Yee BK, Yu MC, Hartshorne T, Agabian N, Campbell DA (1998) Three Small Nucleolar RNAs Identified from Spliced Leader-Associated RNA Locus in Kinetoplastid Protozoans. *M. Cell Biol.* **18**: 4409-4417.
- Rubenstein JL, Greengard P, Czernik AJ (1993) Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin. *Synapse* **13**: 161-72.
- Sasaki K, Shima, H, Kitagawa Y, Irino, S, Sugimura, T, Nagao M (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 α gene in the rat hepatocellular carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**: 1272-1280.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 311-316.

- Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, 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. *Cir. Res.* **90**: 500-502.
- Skinner JA és Slatiel AR (2001) Cloning and identification of MYPT3: prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem. J.* **356**: 257-260.
- Somlyo AP és Somlyo AV (2003) Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* **83**: 1325-1358.
- Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP (2000) Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**: 652-659.
- Strack S, Kiny S, Ebner FF, Wadzinski BE, Colbran RJ (1999) Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J. Comp. Neurol.* **413**: 373-84.
- Surks HK, Richards CT, Mendelsohn ME (2003) Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA. *J. Biol. Chem.* **278**: 51484-51493.
- Takai A, Bialojan C, Troschka M, Ruegg JC (1987) Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.* **217**: 81-4.
- Takizawa N, Koga Y, Ikebe M (2002a) Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 773-778.
- Takizawa N, Niino N, Ikebe M (2002b) Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. *FEBS Lett.* **515**: 127-132.
- Tan I, Ng CH, Lim L, 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.

- Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* **429**: 780-784.
- Terry-Lorenzo RT, Carmody LC, Voltz JW, Connor JH, Li S, Smith FD, Milgram SL, Colbran RJ, Shenolikar S (2002) The neuronal actin-binding proteins, neurabin I and neurabin II, recruit specific isoforms of protein phosphatase-1 catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* **277**: 27716-24.
- Tóth A, Kiss E, Gergely P, Walsh MP, Hartshorne DJ, Erdődi F (2000b) Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interactions 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, Erdődi F (2000a) Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1687-1697.
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hosoya H, Hartshorne DJ, Matsumura F (1999) Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J. Cell. Biol.* **144**: 735-744.
- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **164**: 427-439.
- Tung HY, De Rocquigny H, Zhao LJ, Cayla X, Roques BP, Ozon R (1997) Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7: vpr. *FEBS Lett.* **401**: 197-201.
- Velasco G, Armstrong C, Morrice N, Frame S, Cohen P (2002) Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1 M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett.* **527**: 101-104.
- Vultseke V, Beullens M, Waelkens E, Stalmans W, Bollen M (1997) Properties and phosphorylation sites baculovirus-expressed nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1). *J. Biol. Chem.* **272**: 32972-32978.
- Wera S és Hemmings BA (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* **311**: 17-29.
- Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdodi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ, Haystead TA (2004) Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation

- of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **279**: 34496-504.
- Wu J, Liu J, Thomson I, Oliver CJ, Shenolikar S, Brautigan DL (1998) A conserved domain for glycogen binding in protein phosphatase-1 targeting subunits. *FEBS Lett.* **439**: 185-191.
- Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 658-663.
- Wu Y, Erdödi F, Murányi A, Nullmeyer KD, Lynch RM, Hartshorne DJ (2003) Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **24**: 499-511.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdődi Ferenc egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, aki hozzáértő szakmai segítségével mind gyakorlati, mind elméleti ismereteimet bővítette az itt eltöltött TDK, illetve Ph.D. hallgatóként eltöltött évek alatt. Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, aki munkámat mindig támogatta.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor szívesen fordulhattam hozzájuk segítségért. Külön szeretném megköszönni Dr. Csontos Csilla és Dr. Kiss Enikő barátságát és a tőlük munkám során kapott tanácsokat. Köszönöm Dr. Németh Árpádnénak a mindennapos kísérletes munkámban való hatékony segítségét. Köszönöm Tar Krisztina, Kakuk Anna, Kiss Andrea és Kókai Endre barátságát és az együtt töltött hallgatói évek során kapott biztatást és szakmai segítséget.

Dr. Serfőző Zoltánnak, kollaborációs partnerünknek köszönöm az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott szakmai segítségét.

Köszönöm Dr. Vereb György és Friedländer Elza segítségét a konfokális mikroszkópos technika elsajátításában nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. William T. Gerthoffer és Dr. Cherie A. Singer (University of Nevada, Reno), akik segítségével elmélyíthettem molekuláris biológiai tudásom és gyakorlati alkalmazásában is jártasságot szerezhettem.

Hálás köszönettel tartozom szüleimnek, aki szeretetükkel végig támogattak tanulmányaim során. Köszönöm férjemnek, Dr. Lengyel Szabolcsnak, aki türelmével és szeretetével ezernyi módon segítette munkámat.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- Lontay, B.**, Kiss, A., Gergely P., Hartshorne D. J., Erdődi F. Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell. Signal.* (közlés alatt) (2005) (IF=5,19)
- Lontay, B.**, Serfőző Z., Gergely P., Ito M, Hartshorne D. J. and Erdődi F. Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells *J. Comp. Neur.*; 478: 72-87 (2004) (IF=3,5)

Egyéb közlemények:

- Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, **Lontay B**, Erdődi F, Bánfalvi G, Nemes Z, Udvardy M, Altörjay I. Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. *Scan. J. Gastroenterol.* (2005) (közlés alatt) (IF=2,3)
- Singer CA, **Lontay B.**, Gerthoffer WT. Downstream effector of Src signalling pathways involved in cytokine-stimulated gene expression in human airway myocytes (bírálatra beküldve)

Idézhető absztraktok

- Szirák, K., Zeke, T., **Lontay, B.**, Grosz, G., Dombrádi, V., Fehér, Zs., Identification of proteins interacting with Ser/Thr protein phosphatases of *Neurospora crassa* using the yeast two-hybrid system. *Yeast* **18**: S168 (2001) (IF=2,54)
- Serfőző, Z., Kiss, B. P., Erdődi, F., **Lontay, B.**, Varga, V. Thyroid hormone affects nitric oxide synthase content in the developing cerebral cortex and hippocampus of postnatal rats. *Eur. J. Neurosci.* **12**: 127,03/172 (2001) (IF=3,92)

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások:

- Lontay B.**, Tóth A., Hartshorne D.J., Erdődi F. Protein foszfatáz-1 katalitikus alegységet kötő fehérjék vizsgálata immunológiai módszerekkel *XXIX. Membrán-társzport konferencia*, Sümeg, 1999
- Lontay B.**: Protein foszfatáz-1 katalitikus alegységet kötő fehérjék vizsgálata májban. *Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, 2000
- Lontay B.**: A miozin foszfatáz kimutatása és lokalizációja emlős szövetekben, *Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, 2002
- Lontay B.**: A miozin foszfatáz vizsgálata nem-izom szövetekben, *Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Konferencia*, Hőgyész, 2003
- Lontay B.**: A miozin foszfatáz lokalizációjának patkány agyban, *Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, 2003

Lontay B. Miozin foszfatáz szabályozása és kölcsönhatásai nem-izom sejtekben, *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. munkaértekezlete*, Sopron, 2004

Posztterek:

Lontay B., Tóth A., Kiss E., Bai P., Erdődi F.: Protein foszfatáz-1 katalitikus alegységet kötő fehérjék vizsgálata immunológiai módszerekkel, *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának Munkaértekezlete*, Eger, 1999

Lontay B., Tóth A., Kiss E., Gergely P., Erdődi F.: Protein foszfatáz-1 katalitikus alegységet kötő fehérjék vizsgálata patkány májban, *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának Munkaértekezlete*, Sopron, 2000

Kiss, E., **Lontay B.**, Gergely, P., Erdődi, F. Antibodies specific for N-terminal regions of the myosin phosphatase target subunit modulate phosphatase activity and substrate specificity *Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases EMBO Conference*, Marburg, Germany, 2001

Lontay B., Serfőző Z., Gergely P., Erdődi F.: A miozin foszfatáz kimutatása és lokalizációja emlős szövetekben, *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának Munkaértekezlete*, Keszthely, 2002

Lontay B., Serfőző Z., Gergely P., Erdődi F.: Localization of myosin phosphatase in mammalian tissues, *3rd International Conference on Signal Transduction*, Dubrovnik, 2002

Lontay B., Serfőző Z., Gergely P., Erdődi F.: Localization and possible functions of myosine phosphatase in neuronal cells *FASEB Summer Research Conferences, Protein Phosphatases*, Snowmass Village, Colorado, 2004