

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

1, BEVEZETÉS

Az eukarióta szervezetek sejtfolymatainak alapvető szabályozási mechanizmusa a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. A protein kinázok a fehérjék foszforilációját katalizálják, amely során nukleozid-trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfát csoportját építik be szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncokba. A foszforiláció reverzibilitását a protein foszfatázok (PP) biztosítják a fehérjékben észterkötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisével. A protein foszfatázok katalitikus alegységei a hozzájuk kapcsolódó szabályozó alegységekkel alkotnak holoenzimet. A szabályozó alegységek a holoenzim szubsztrátspecifitását valamint katalitikus aktivitását befolyásolják, mivel a katalitikus alegységhez és a szubsztráthoz is kötődve az enzimeket különböző szubcelluláris kompartmentekhez irányítják. A miozin foszfatáz (MP) a Ser/Thr specifikus protein foszfatáz 1 (PP1) enzimesalád tagja, amely PP1 katalitikus alegységből (PP1c), miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (myo^sin phosphatase target subunit, MYPT) és egy eddig még ismeretlen funkciójú 20 kDa szabályozásában játszik döntő szerepet.

A miozin foszfatázt először izomszövetekben jellemezték és szerepét a kontraktilitás szabályozásában ismerték fel, amely a miozin-II 20 kDa könnyűláncának (MLC20) defoszforilációja által valósul meg. Az elsősorban simaizomban és a legtöbb nem-izom sejtben is megtalálható miozin izoforma, a miozin-II, foszforilációja sokféle sejtfolymatban játszik kulcsszerepet, így a simaizom és nem-izom sejtek kontrakciójában, a sejtek motilitásában, adhéziójában, a citokinézisben, a citoszkeleton átrendeződésében, a trombociták aktiválásban és különböző ioncsatornák szabályozásában. Az 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 szabályzódik, amelynek egyik legfontosabb eleme szintén az MLC20 foszforilációja. A MLC20

foszforilációjának növekedése a sejtekben fokozza a stresszrostok és fokális adhézciók 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, valamint a miozin foszfatáz aktivitása sokoldalúan, számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozható. Ezen szabályozási mechanizmusok tanulmányozásának modelljéül sokáig a simaizom kontrakciós folyamatok vizsgálata szolgált. 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+} -kaldmodulin (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, amely az izom relaxációját eredményezi. E mechanizmusban a miozin foszfatáz szerepéről azt feltételezték, hogy a miozin defoszforilációjával mindössze a folyamat reverzibilitását biztosítja.

A miozin foszfatáz szabályozásának az izomösszehúzódásban játszott alapvető szerepére azok a kísérletek hívták fel a figyelmet, amelyekkel kimutatták, hogy a foszfatáz membránpermeabilis toxinokkal történő gátlása önmagában is izomkontrakciót és miozin foszforilációt indukál, alacsony $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és MLCK aktivitás mellett is. A foszfatáz gátlás jelentőségén kívül 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett megvalósuló miozin foszforilációt, lassú fenntartott kontrakcióval, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -el kezelt permeabilizált simaizmokban. A folyamat molekuláris hátterét tanulmányozva kimutatták, hogy a $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 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 ezáltal aktivált protein kinázokhoz (PKA, PKG) kötött, de a mechanizmus még nem minden részletében tisztázott.

A MP szabályozása tehát gátlási és aktiválási folyamatok együttes hatására jön létre. Gátló hatást fejt ki a MYPT1 foszforilációja adott foszforilációs helyeken, a miozin foszfatáz holoenzim disszociációja, a holoenzim lokalizációjának változása vagy inhibitor fehérjékkel történő gátlása is, míg aktiválása a ciklikus nukleotidok koncentrációjának növekedésével állhat kapcsolatban. A MYPT1 foszforilációs helyei közül kiemelkedő jelentőségű a Thr695 gátló foszforilációs hely, amelyet ROK mellett egyéb kinázok (integrinekhez kapcsolódó kináz (ILK), leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK), p21-aktivált protein kináz (PAK)) is foszforilálhatnak. A ROK, ZIPK és az ILK a miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása mellett szintén foszforilálja a MLC20 Ser19 és a Thr18 foszforilációs helyeit, így részt vesz a Ca^{2+} -tól független kontrakció indukálásában. A másik ROK által foszforilált oldallánc a Thr850, amelynek szabályozó funkciója még nem ismert.

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

2. CÉLKITŰZÉSEK

A miozin foszforiláció és ebben a miozin foszfatáz szerepét széleskörűen tanulmányozták izomszövetekben, ahol jelentőségét az izomkontrakció szabályozásában és a miozinhoz kötött más citoskeletális változásokban mutatták ki. A MP a miozin mellett más, az aktinhoz és egyéb filamentumokhoz kötődő fehérjéket (adducin, moezin, Tau, MAP-2) is képes defoszforilálni, tehát a kontraktilitás mellett más sejtfolyamatok szabályozásában is részt vehet. Ezt megerősíti az is, hogy a MYPT1 izoforma minden eddig vizsgált eukarióta sejtben jelen van, sejtben belüli lokalizációja viszont nemcsak a miozint tartalmazó szubcelluláris kompartmentekre korlátozódik.

Hipotézisünk szerint a miozin foszfatáz további fiziológiai szerepének megismerését segítheti az enzim lokalizációjának feltárása különböző nem-izom sejtekben, és az enzim szerepének és szabályozásának megértéséhez hozzájárulhat új kölcsönható fehérjék kimutatása és azonosítása. A disszertáció kísérletes anyagában agy és májszövet eredetű sejtek (idegsejtek és hepatociták) tanulmányozását végeztük. Az agy felépítése sokrétű és funkciója specializálódott, összetettségét egyik szervrendszer sem múlja fölül a humán szervezetben. Ezen szövetre nem jellemző a citoskeletális változásokat is igénylő élénk proliferáció vagy sejtjárási, a citoskeletális elemek mégis fontosak lehetnek a szinaptikus plaszticitás során formálódó idegrendszerben vagy a neurotranszmittereket szállító vezikulák transzportjában. A májat anatómiailag és szövettanilag homogénebb szerkezet jellemző, mint az agyat. A miozin foszfatáz, a MYPT1 szabályozó alegység, valamint a miozin II jelenlétét mind agy- és májszövetben kimutatták. Előzetes vizsgálatainkban leírtuk, hogy a miozin foszfatáz számos szubcelluláris kompartmenttel asszociál az idegsejtekben és a hepatocitákban is. Ez arra utal, hogy az enzimnek feltehetően olyan szubsztrátja(i) is lehetnek, amelyek a kontraktilis sajátosságoktól eltérő sejtfunkciókban fontosak.

A miozin foszfatáz MYPT alegysége több oldalláncon foszforilálódik, ezeket a foszforilációs folyamatokat *in vitro* számos protein kináz katalizálja. Keveset tudunk

azonban az *in vivo* szerepet játszó kinázokról és foszfatázokról. A protein foszfatáz 2A (PP2A) enzimet *in vitro* vizsgálatok alapján MYPT1 foszfatázként valószínűsítették, fiziológiai szerepéről azonban a MYPT1 foszforilált oldalláncainak (pl. Thr695 és Thr850) defoszforilációjában keveset tudunk. A felvetett kérdések alapján kutatási célkitűzéseink az alábbiakban foglalhatók össze.

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

- az MP és MYPT1 régióspecifikus és a szubcelluláris megoszlásának vizsgálata
- MYPT1-el kölcsönható neuronális fehérjék kimutatása és azonosítása.

2. A foszfatázgátló OA-val indukált MYPT1 és miozin foszforiláció, valamint sejtmotilitás változás tanulmányozása HepG2 sejtekben:

- a MP és MYPT1 megoszlásának vizsgálata HepG2 szubcelluláris frakciókban
- az OA által kiváltott miozin és a MYPT foszforiláció és lokalizáció, és a PP2A aktivitás változás kapcsolatának tanulmányozása
- az OA hatásának tanulmányozása a stresszrostok képződésére és a HepG2 sejtek migrációjára.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 *Lizátumok preparálása patkány agyrégiókból Western blot analízishez*

Wistar patkányok alábbi agyrégióit különítettük el: *bulbus olfactorius*, agykéreg, *striatum*, *hippocampus*, köztiagy, középagy, utóagy és kisagy. A szöveteket jéghideg foszfát pufferben (PBS: 8,06 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137,9 mM NaCl (pH 7,4)) mostuk. Valamennyi agyrégióhoz 1 ml jéghideg homogenizáló puffert (20 mM HEPES (pH 7,5), 0,25 M szacharóz, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA és proteázgátlók)) adtunk. A szövetdarabokat homogenizáltuk, majd 10 percig (+ 0,1 % Triton X-100) jégen tartottuk. Ezt ultrahangosan feltárás követte.

3.2 *Primer hippocampus és nucleus cochlearis sejt kultúra preparálása*

A *hippocampus* és a *nucleus cochlearis* sejtek preparálásához 3 napos Wistar patkányokból eltávolítottuk a megfelelő agyrégiókat, és 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 proteolízist 0,25 % tripszint tartalmazó oldattal végeztük. Az emésztett agyrészeket 10 % FBS/MEM-ben trituráltuk. Ezt követően a sejteket 10 % FCS, 0,1 µg/ml NGF, 12 U/ml penicillin és 10 µg/ml streptomycin tartalmú MEM-ben tenyésztettünk.

3.3 *Szinaptoszóma és posztzinaptikus denzitás frakciók izolálása patkány kisagyból*

A szinaptoszóma és posztzinaptikus denzitás frakciók izolálását az irodalomban leírt módszer szerint módosításokkal végeztük patkány agykéregből. A szinaptoszómát és mitokondriumot tartalmazó homogenizátumot szacharóz grádiens (0,8 M, 1,0 M és 1,2 M szacharóz) centrifugálással választottuk el (83000 g, 2 óra), majd a posztzinaptikus denzitás további izolálásához újabb szacharóz grádiens (0,8 M, 1,5 és 2,0 M szacharóz) centrifugálást (202300 g, 2 óra) végeztünk.

3.4 *HepG2 sejt kultúra és a sejtek kezelése inhibitorokkal*

A kísérletekhez humán hepatokarcinóma (HepG2) sejteket használtunk. 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. A sejteket inhibitorokkal történő kezeléshez 12 órán át 0,1% FBS-tartalmazó D-MEM-ben szinkronizáltuk és éhezettük. A HepG2 sejteket 5-50 nM OA, 10 μ M Y27632 inhibitorral, vagy a két effektor kombinációjával inkubáltuk 60 percig. A kezelést követően a sejteket RIPA pufferben (1% Nonidet P-40, 1% nátrium deoxikolát, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,01 M nátrium-foszfát (pH 7,2), 2 mM EDTA, 50 mM nátrium-fluorid) lizáltuk.

3.5 HepG2 sejtek szubcelluláris frakcióinak preparálása

HepG2 sejtek lizátumából sejtmag, citoplazma, mikroszóma/mitokondrium, citoszkeleton és plazmamembrán frakciókat izoláltuk. A sejteket homogenizáló pufferrel (0,25 M szacharóz, 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, proteázgátlók) homogenizáltuk, majd 0,5% Nonidet P-40-et adtunk hozzá. A lizátumot centrifugáltuk (8000 g, 15 m.perc). A pelletet A pufferben (0,25 M szacharóz, 10 mM HEPES (pH 7,9), 3,3 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT és proteázgátlók) szuszpendáltuk és centrifugáltuk. A pelletet B pufferben (A puffer 0,35 M szacharózzal) újra szuszpendáltuk és centrifugáltuk. A pelletet B pufferben vettük fel, majd ultrahangos kezelésnek vetettük alá. A feltárás során kapott szuszpenzió a *sejtmag frakció*. A 8000 g centrifugálással kapott felülúszót centrifugáltuk (1250 g, 20 perc), majd az így kapott felülúszó komponenseit ultracentrifugálással választottuk el: a pellet a *mikroszóma/mitokondrium frakciónak*, a felülúszó a *citoszol frakciónak* felelt meg. Az 1250 g centrifugálás pelletét 1% Nonidet P-40-et tartalmazó homogenizáló pufferben szuszpendáltuk, majd tovább ultracentrifugáltuk; a felülúszó a *plazmamembrán frakciónak*, míg a pellet a *citoszkeleton frakciónak* felelt meg.

3.6 Western blot

A fehérje koncentráció meghatározásához BCA reagenst használtunk. A fehérjéket SDS-PAGE-sel választottuk el. A géleket nitrocellulóz membránra blottoltuk, és a blokkolásához 5 % tejpor/ 0,05 % Tween 20/PBS-t használtunk. A blokkolást követően a membránokat elsődleges és HRP-konjugált másodlagos

antitesttel inkubáltuk, az immunreakciókat ECL reagenssel detektáltuk. Az agyrégiók relatív MYPT1 mennyiségének meghatározásához kvantitatív Western blot analízist végeztünk, amelyhez standardként His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ peptidet használtunk (1-1000 ng). A blottokat denzitometráltuk és a Molecular Analyst Software (BioRad) Volume Analyse mellékprogramjával elemeztük.

3.7 Protein foszfatáz aktivitásmérés

A patkány agyrégiók lizátumának, a szinaptoszóma és posztszinaptikus denzitás ill. a HepG2 sejtek szubcelluláris frakcióinak protein foszfatáz aktivitásának meghatározásához szubsztrátként 2 μM ³²P-miozint vagy 2 μM ³²P-MLC20-at használtunk. Az OA-val (5-1000 nM) inkubált teljes HepG2 lizátum esetén a foszfatáz aktivitást 0,5 μM ³²P-miozin és 0,5 μM ³²P-MLC20 szubsztráttal mértük (0,5-1 perc reakcióidő, 30 °C).

3.8 Immunhisztokémia

Wistar patkányokat transzkardiálisan perfundáltuk. Az agyat *bulbus olfactorius*, előagy, középagy, kisagy és alsó agytörzs régiókra választottuk szét, majd horizontális és szaggitális metszeteket készítettünk. A szeleteket 4% paraformaldehiddel (PFA) vagy acetonnal fixáltuk. A metszeteket blokkoltuk (10% normál lószérum, 0,1% BSA, 0,3% Triton-X 100/ PBS), majd anti-MYPT1¹⁻³⁸ poliklonális antitesttel inkubáltuk. Ezt követően biotinnal-konjugált anti-nyúl IgG-vel vagy alkalikus foszfatázzal-konjugált anti-nyúl IgG-vel inkubáltuk. A detektáláshoz a metszeteket avidin-konjugált FITC-cel inkubáltuk vagy alkalikus foszfatáz reakciót alkalmaztunk.

3.9 Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A sejteket etanollal vagy 4% PFA-val fixáltunk, majd PBS-sel mostuk. 0,05 % Triton X-100/PBS-sel permeabilizáltunk, majd 2 mg/ml BSA/PBS-sel blokkoltuk. A fixált sejteket az elsődleges antitesttel BSA/PBS-ben inkubáltuk, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-vel, Alexa 633-konjugált anti-egér másodlagos antitesttel vagy F-aktin festéséhez Alexa 633-konjugált falloidinnel inkubáltunk. A sejtmag festéshez 1 mg/ml propídium jodidot használtunk. A fedőlemezeket Antifade Light

Kit segítségével fedtük le. A sejteket és metszeteket Hélium/Neon és Krypton/Argon lézer detektorokkal felszerelt Zeiss LSM 410 konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.10 Immunprecipitáció

Protein-A Sepharose-t anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel inkubáltunk immunprecipitációs 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), majd a szuszpenziót centrifugáltuk. A *hippocampus*ból származó extraktumot Protein-A Sepharose-zal előtisztítottuk, majd anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel-kötött Protein-A Sepharose-zal inkubáltuk. A Protein-A Sepharose gyantát növekvő sókoncentrációval és detergenssek jelenlétében, majd PBS-sel mostuk. A fehérjéket SDS-PAGE-sel választottuk el.

3.11 GST-MYPT pull-down vizsgálat

Glutation-Sepharose-t kötő pufferrel ekvibráltunk (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 proteáz inhibitorok), majd 0,1 μ M GST-t (glutation-S-transzferáz) vagy GST-MYPT1-et tartalmazó oldattal inkubáltuk. A szinaptoszóma frakciót előtisztítottunk Glutation-Sepharose-zal, majd GST-vel vagy GST-MYPT1-tel kapcsolt Glutation-Sepharose-zal inkubáltuk. A gyantát kötő pufferrel mostuk, majd a gyanta által kötött fehérjéket SDS minta pufferrel történő forralással szolubilizáltuk.

3.12 Sejtmigrációs vizsgálatok

A sejtmigráció kvantitatív méréséhez fibronektinnel borított sejtmigrációs kité (Chemicon Int., ECM 500) használtunk. A HepG2 sejteket ($2,5 \times 10^5$ sejt/Boyden kamra) 18 óráig szérummentes D-MEM-ben éhezítettünk, majd 5 nM vagy 50 nM OA, 10 μ M Y27632, vagy a két effektorral együtt inkubáltuk 18 órán át. Kemoattraktánsként 50 ng/ml HGF-t használtunk. A membránon keresztül migrált sejteket fixáltuk, festékekkel inkubáltuk, majd mostuk, és a sejtekben akkumulálódott festéket extrakciós pufferrel kinyertük. A migráció mértékével arányos festékmennyiség abszorbanciáját 540 nm-en mértük.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1 A miozin foszfataz és a MYPT1 lokalizációjának tanulmányozása agyszövetben és primer neuronokban

A patkány agyban a MYPT1 és a MYPT2 izoformák is expresszálódnak, azonban a mindkét izoformára specifikus antitesttel kapott Western blot alapján arra következtettünk, hogy a MYPT1 mennyisége jelentősen meghaladja a MYPT2 mennyiségét. Ezért a fő MYPT izoformának tekinthető MYPT1 lokalizációját és fehérjével való kölcsönhatását tanulmányoztuk.

4.1.1 Régióspecifikus és szubcelluláris megoszlás vizsgálata, immunoblottal, a miozin foszfataz aktivitás meghatározásával és immunfluoreszcenciával

A MYPT1 expresszióját valamennyi agyrégióban kimutattuk és koncentrációját kvantitatív Western blot analízissel meghatároztuk. A MYPT viszonylag nagyobb mennyiségben volt jelen az agykéreg, *bulbus olfactorius*, *striatum*, *hippocampus* és köztiagy régiókban, és kisebb mennyiségben a középagy és utóagy régiókban. Az agyrégiókban mért MYPT1 koncentráció (30-78 nmol/g fehérje) összevethető a simaizom sejtekben és nem-izom sejtekben becsült MYPT1 koncentrációval. A MP specifikus aktivitása (1,1-2,7 nmol/perc/mg) az agyrégiók lizátumaiban hasonló volt az előzőleg simaizom és nem izom sejtekben talált értékekhez. A középagyban és az utóagyban a MYPT1 mennyisége és a miozin foszfataz aktivitása is 1,5-2-ször kisebb volt, mint más agyrégiókban. A MP aktivitás és MYPT1 különböző agyrégiókban detektált relatív mennyiségi eltéréseinek fiziológiai jelentőségét, ill. a különböző mértékű expresszió molekuláris hátterét még nem ismerjük.

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal a MYPT1-et valamennyi agyrégióban detektáltuk, de különböző festődést mutatott az eltérő agyi magokban és idegpályák esetén. 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 sejtestjeiben és a *hippocampus*ba futó idegpályákban is. A MYPT1 számos, de nem mindegyik idegsejt sejtmagjában és bizonyos idegsejtek magvacskájában is jelen van. A MYPT1 lokalizációját sejtmagban már korábban kimutatták, jelenlétének igazolása a magvacskákban azonban új megfigyelés. Megjegyzendő, hogy a MYPT1-et a magvacskákban csak a szöveti metszeteken észleltük, primer *hippocampus* és *nucleus cochlearis* sejtekben a magvacskák nem mutattak MYPT1 festődést. A primer idegsejteken 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. Ez arra utal, hogy a MYPT1 lokalizációját számos tényező befolyásolhatja, beleértve a sejtek fiziológiai állapotát, a sejtek korát és fejlődési stádiumát. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a MYPT1 megoszlása az agyban, ill. az idegsejtekben nem homogén, hanem funkciójukat tekintve specializálódott régiókhoz, ill. sejten belül bizonyos kompartmentekhez kötött. Ez, a miozintól meglehetősen eltérő lokalizációs mintázat, a miozin foszfatáz általánosabb sejtfuncióit és a miozintól eltérő alternatív szubsztrátok jelenlétére utal. Feltételezhető tehát, hogy idegsejtekben az enzim defoszforiláló aktivitásának célpontja a foszforilált miozin II-től eltérő szubsztrátok is lehetnek.

4.1.2 A MYPT1-el kölcsönható neuronális fehérjék kimutatása és azonosítása immunprecipitációval és specifikus kölcsönhatásokon alapuló (pull-down) módszerrel.

Primer idegsejtekben kimutattuk mind a MYPT1 és a PP1c δ kolokalizációját szinaptofizinnel, amely preszinaptikus markerként és szinaptikus vezikulák integráns membrán fehérjéjeként is ismert. A MYPT1 és a szinaptofizin lehetséges kölcsönhatásának bizonyítására, valamint már ismert MYPT1-el asszociáló fehérjékkel való kölcsönhatás igazolására az agyrégiók kivonatából

immunprecipitációt végeztünk MYPT1-re specifikus antitesttel. Az immunprecipitáció során kölcsönható partnerként azonosítottuk a ROK, PP1c δ és a szinaptofizin fehérjét, valamint a PP1c δ -tól eltérő PP1c izoformákat. Ezekből az adatokból részben arra következtetünk, hogy az idegsejtek miozin foszfataz holoenzimében, hasonlóan a simaizomhoz, a MYPT1-gyel asszociált fő PP1c izoforma a PP1c δ . Ezt megerősíti a PP1c δ és a MYPT1 koprecipitációja, valamint a PP1c δ MYPT1-hez hasonló megoszlása az agyrégiókban. Ennek ellenére a MYPT1 és PP1c δ részben különböző lokalizációja primer idegsejtekben arra utal, hogy a MYPT1 átmenetileg a PP1c δ -tól disszociált állapotban, vagy más PP1c izoformákhoz kapcsolódva is előfordulhat. Az utóbbi lehetőségre utal, hogy a PP1c α és PP1c γ izoformák is koprecipitálódtak a MYPT1-gyel agykivonatból. Más neuronális PP1c-t kötő alegységek (neurofilament-L, a neurabin I vagy a neurabin II) preferenciáját a PP1c α és/vagy PP1c γ izoformák iránt már korábban kimutatták. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a MYPT1 az első olyan idegsejtekben azonosított PP1c szabályozó alegység, amely elsődlegesen a PP1c δ -val alkot holoenzimet.

A MYPT kölcsönhatása a szinaptofizinnel felvetette annak a lehetőségét, hogy a MP a szinaptikus vezikulák és azon belül a preszinapszisok egyik fontos Ser/Thr specifikus foszfataz komponense lehet. Szinaposzóma és posztszinaptikus denzitás frakciókat izoláltunk és vizsgáltuk a miozin foszfataz, MYPT1 és a MYPT1-gyel kölcsönható fehérjék (ROK, szinaptofizin és PP1c δ) eloszlását. A miozin foszfataz aktivitás a szinaptoszómában magas, míg a posztszinaptikus denzitás frakcióban alacsony volt. 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 a GST-MYPT1-el végzett pull-down vizsgálat is alátámasztotta. Az eddig idegrendszerben, ill. idegsejtekben leírt PP1 szabályozó alegységek mindegyikét a posztszinaptikus denzitásokban mutatták ki. Eredményeink szerint tehát a MYPT1 az első preszinaptikus membránban leírt idegrendszeri PP1c szabályozó alegység. A szinaptofizin foszforilálható, és foszforilációja befolyásolja a

neurotranszmitterek felszabadulását. A MYPT1 kölcsönhatása a szinaptofizinnel arra utal, hogy a miozin foszfataznak új szubsztrátként célpontja lehet a szinaptofizin fehérje is, és ezzel az idegsejtekben szerepet játszhat a vezikulák szállításában és a neurotranszmitter kibocsátás szabályozásában is. A mechanizmus további résztvevője lehet a ROK is, amelyről ismert, hogy a RhoA/ROK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja a miozin foszfataz aktivitását a MYPT1 gátló helyen (Thr695) történő foszforilációjával. A ROK és az MP számos közös szubsztrátja (pl. adducin, moezin, Tau) ismert, az azonban még bizonyításra vár, hogy vajon a szinaptofizin foszforilációja és defoszforilációja is szabályozható-e ezzel az enzimpárral.

4.2 Foszfatazgátló okadainsavval indukált MYPT1 és a miozin foszforiláció, valamint sejtmotilitás változás tanulmányozása HepG2 sejtekben

4.2.1 A miozin foszfataz és MYPT1 megoszlásának vizsgálata HepG2 sejtekben és szubcelluláris frakciókban

A MYPT1 szubcelluláris lokalizációját HepG2 sejtekben Western blot analízissel, protein foszfataz aktivitásmérési eljárással, valamint immunfluoreszcenciás módszerrel is vizsgáltuk. A MYPT1 viszonylag nagyobb koncentrációban volt jelen a sejtmagban, citoskeletonban és a mikroszómá-mitokondrium frakciókban, mint a citoszolban és a plazmamembránban. A miozin foszfataz aktivitás eloszlása hasonló volt a Western blottal kapott MYPT1 szintekhez. Következtetésünk az, hogy a miozin foszfatazt a MYPT1 alegység irányítja az adott szubcelluláris kompartmentekbe, és a MP szerepet játszhat a mikroszómális/mitokondriális és sejtmagi foszforfehérjék defoszforilálásában is. A MYPT1 festődést mutatott a citoplazmában és foltszerű szerkezetekben koncentrált a sejtmagban. Tanulmányoztuk a foszfatazgátló OA hatását a MYPT1 lokalizációjára és foszforilációjára a HepG2 sejteken. 50 nM OA kezelés hatására a MYPT1 a citoszolból a plazmamembránban transzlokálódott, ezzel szemben a sejtmagban mutatott festődése nem változott.

4.2.2 Az OA-által kiváltott miozin és a MYPT foszforiláció és lokalizáció, és PP2A aktivitás változás kapcsolatának vizsgálata

50 nM OA növelte a miozin II foszforilációs szintjét és a foszforilált MLC20 a HepG2 sejtek központi részében koncentrált. A ROK gátlása az OA által kiváltott MLC20 foszforiláció növekedést részlegesen csökkentette. Az OA növelte a MYPT1 Thr695 (MYPT1^{pThr695}) és Thr850 (MYPT1^{pThr850}) oldalláncok foszforilációjának mértékét is. A MYPT1 két foszforilációs helye szelektív foszforilációt és eltérő lokalizációt mutatott OA kezelés hatására: a MYPT1^{pThr695} a plazmamembránban volt jelen, míg a MYPT1^{pThr850} a perinukleáris régióban és a sejtmagban koncentrált. Az OA által kiváltott foszforilációt a specifikus ROK inhibitor (Y27632) kezelés a Thr695 oldalláncon csak kis mértékben, míg a Thr850 oldalláncon jelentős mértékben gátolta. Ezek az adatok arra utalnak, hogy ROK-tól eltérő kináz(ok) játszhatnak szerepet a Thr695 foszforilációjában, míg a Thr850 foszforilációját a ROK közvetlenül, vagy közvetve szabályozza.

Az OA kezelés hatására kiváltott MLC20 foszforiláció növekedés a MP gátlására utal. A kísérletekben alkalmazott OA koncentrációk (5-50 nM) HepG2 lizátumban nem befolyásolták a miozin foszfatáz aktivitását, viszont gátolták a PP2A enzimeket. Irodalmi adatokból ismert, hogy a PP2A a MYPT1 foszforilált Thr850 és Thr695 oldalláncának defoszforilációját katalizálja. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az OA a PP2A gátlásával közvetetten, a MYPT1 foszforilációs szintjének növelésével fejt ki gátló hatását a MP aktivitására. Western blottal és immunfluoreszcenciával is detektáltuk a MYPT1 foszforiláció növekedését a Thr695 gátló foszforilációs helyen. A MYPT1 foszforiláció növekedése a Thr850 oldalláncon gyengíti a MP és a miozin kölcsönhatását, ami szintén csökkent miozin defoszforilációban növekedésében nyilvánulhat meg. Emellett a MYPT1 transzlokációja a membránhoz szintén a miozin II-től való térbeli elkülönülést és csökkent miozin-II defoszforilációt eredményezhet.

A Thr850 oldalláncon az Y27632 gátolta az OA-által kiváltott foszforilációt, ezért feltételezhető, hogy a ROK és PP2A szerepet játszik a MYPT1 reverzibilis

foszforilációjának szabályozásában. Ezzel összhangban a PP2A és a ROK eloszlása az OA-val kezelt HepG2 sejtekben hasonló volt a MYPT1^{pThr850}-hez, azaz az OA hatására megfigyeltük a ROK és a PP2A koncentrációját is a sejtmagban és a perinukleáris régióban. A Thr695 oldallánc foszforilációját Y27632 jelentősen nem befolyásolta, ezért feltehető, hogy ezt a foszforilációs helyet ROK-tól eltérő citoplazmatikus és/vagy membrán-asszociált kináz(ok) foszforilálják. HepG2 sejtek citoplazmájában kimutattuk a ZIPK jelenlétét, amely a ROK mellett a MLC20 OA indukált foszforilációjában játszhat szerepet.

4.2.3 Az okadainsav hatásának tanulmányozása a stresszrostok képződésére és a HepG2 sejtek migrációjára.

Az OA kezelés stresszrostok kialakulását is indukálta HepG2 sejtekben, amelyek képződését viszont a ROK inhibitor teljesen gátolta. OA gátolta a HepG2 sejtek migrációját is, de ez a hatás Y27632 jelenlétében nem volt megfigyelhető. Tehát a ROK aktivitása és a MP gátlása is szükséges a miozin II megnövekedett foszforilációjához, a stresszrostok kialakulásához és a migráció gátlásához. A sejtek migrációjában a miozin II foszforilációjának a sejtestest kontrakciójában és a sejt hátsó részének felválásában van szerepe. 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 stressz rostokat és fokális adhéziókat- azok lassúbb „turnover-ét” eredményezi, ami stabilabb adheziós 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 sejtmigráció farmakológiai befolyásolását célzó kutatásokhoz is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A miozin foszfataáz (MP) egy protein foszfataáz-1 katalitikus alegység δ izoformából (PP1c δ) és egy 130/133 kDa miozin kötő alegységből (MYPT1) áll. Elsődleges szerepe a miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja, amely fontos szerepet játszik a simaizom kontrakciójában és más citoszkeletális folyamatokban. A MP a miozinon kívül más fehérjéket is defoszforilál, emellett jelenléte feltételezhető más szövettípusokban is. Célunk a MP lokalizációjának, szabályozási mechanizmusainak és lehetséges fiziológiai jelentőségének tanulmányozása volt nem-izom szövetekben (agy és máj), ahol az adott szövetek specifikus működése és simaizomszövettől való nagymértékű eltérése a simaizom MP eltérő szerepét sugallja.

Eredményeink szerint a MYPT1 jelen van agyszövetben és humán hepatokarcinóma sejtekben (HepG2) is. Valamennyi agyrégióban kimutatható, de koncentrációja specifikus magcsoportokhoz általános idegrendszeri szerepe mellett specifikus fiziológiai jelentőségére is utal. A MP-t kimutattuk az agykéregből izolált szinaptoszómák preszinaptikus frakciójában, ahol kölcsönhatását igazoltuk a szinaptofizin fehérjével, valamint a Rho asszociált kinázzal (ROK). A MP tehát szerepet játszhat a szinapszisok vezikuláris transzportfolyamataiban és a neurotranszmitterek kibocsátásában a szinaptikus részbe.

A másik tanulmányozott sejtípus az agytól mind funkciójában és morfológiájában eltérő HepG2 sejtek voltak. A MYPT1 jelen volt valamennyi szubcelluláris régióban, kiemelkedő mennyiségben a sejtmagban, a citoszkeletonban és a mitokondriumban. A foszfataázinhibitor okadainsav (OA) hatását vizsgáltuk olyan koncentrációban, amely a PP2A-t gátolta, de a PP1-et még nem. A MYPT1 két tanulmányozott foszforilációs helye szelektív foszforilációt mutatott. A Thr695 gátló foszforilációs helyen foszforilált MYPT1 populáció a citoszolból a plazmamembránba transzlokálódott, és szabályozásáért feltehetően nem a ROK, hanem más kinázok a felelősek. A Thr850 foszforilált MYPT1 a sejtmagban és a perinukleáris régióban dúsult fel, szabályozása a ROK-függő útvonal által valósul

meg, és defoszforilációjáért feltehetően a PP2A felelős. Ezen foszforiláció sejtmagi szabályozó szerepe még nem tisztázott. Az OA-indukált MP gátlásával stresszkábelek alakultak ki. A MP gátlása a MLC20 foszforilációjának lassabb “turn-overéhez” vezethet a sejt központi részén, ami stabilabb adheziós szerkezeteket és lassabb migrációs rátát eredményez.

A miozin foszfatáz tehát klasszikus szubsztrátjának, a miozin II defoszforilálásán túl, nem-izom szövetekben a citoszkéletális folyamatok és sejtmigráció szabályozása mellett sokrétű feladatokat lát, illetve láthat el, amelyek tanulmányozása a jövő érdekes feladatai közé tartozik.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

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)

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)

Egyéb közlemények:

Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, **Lontay B**, Erdődi F, Bánfalvi G, Nemes Z, Udvardy M, Altorjay 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) (2005)

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)

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. Neurs.* **12**: 127,03/172 (2001)

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-tarnszport 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

Poszterek:

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

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