

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Adaptor fehérjék vizsgálata a vaszkuláris endotéliumban

Boratkó Anita

Témavezető: Dr. Csontos Csilla



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

<< Adaptor fehérjék vizsgálata a vaszkuláris endotéliumban >>

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Boratkó Anita okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Csontos Csilla

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Buday László, akadémikus
Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2013. október 11.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora
Dr. Homolya László, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora
Prof. Dr. Buday László, akadémikus
Dr. Homolya László, az MTA doktora
Prof. Dr. Tózsér József, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2013. október 11. 13:00
Belgyógyászati Intézet A épület tanterme

Bevezetés

Az endotél barrier funkció és az endotél citoszkeleton

A vaszkuláris endotél sejtek konfluens monolayer képeznek az erek belső falán és számos patológiás és élettani folyamatban töltenek be szabályozó szerepet. Elválasztják a keringő vért a szövetektől és csak bizonyos makromolekuláknak és sejteknek biztosítják az átjárást a véráram és a szövetek között. Az endotél sejtek integritásának megtartásában - ami védelmet nyújt az erek permeabilitásának megnövekedése és a gyulladós folyamatok kialakulása ellen - fontos szerepet játszik a sejt-sejt kapcsolatok koordinált működése. A vaszkuláris endotélium jól működő barrier funkciója az endotél sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyát jelzi. Ha az egyensúly a kontraktilis erők irányába tolódik el, akkor az a sejtek közötti rések kialakulását eredményezi. Az endotél sejtek integritása, az endotél sejtek kölcsönhatása a szomszédos sejtekkel és az extracellulláris mátrixszal a barrier funkció betöltésében alapvető jelentőségű. A barrier funkció sérülése számos betegségben megfigyelhető, például gyulladási folyamatokban, trauma, ischemia, diabetes mellitus, multiple sclerosis, trombózis és metasztatikus tumorok képződése közben. Az akut tüdőszérülés (ALI) és akut respirációs distressz szindróma (ARDS) kialakulásakor az endotélium sérülése következtében az alveolusok nem képesek az oxigén-széndioxid cseréjére, valamint a kapillárisok és szövetek közötti folyadékcsere zavara miatt ödéma alakul ki.

A reverzibilis fehérje foszforilációs folyamatok

A reverzibilis fehérje foszforiláció az eukarióta sejtek működésének szinte valamennyi folyamatában megtalálható, mint például génexpresszió szabályozás, fehérje lebontás, fehérje komplexek képződése. A reverzibilis foszforiláció révén megvalósuló szabályozásban a kulcsszerepet játszanak a foszforilációért felelős protein kinázok, valamint a foszfátcsoportok lehasítását katalizáló protein foszfatázok. A humán genomban több mint 500 protein kináz képes az ATP-ből származó foszfát csoportot szerin (Ser,S), treonin (Thr, T) vagy tirozin (Tyr, T) oldallánchoz kapcsolni. A foszforiláció specificitását az adott oldalláncot környező aminosav szekvencia szabja meg. Ezen konszenzus szekvenciák biztosítják az egyes kinázok

számára a felismerő helyet. Az endotél barrier funkció szabályozásának megértéséhez a foszfatázok és kinázok működésének megismerése egyaránt fontos.

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük

A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok osztályozása az aminosavszekvencia homológia és a háromdimenziós szerkezet alapján történik. A katalitikus alegység szerkezetét vizsgálva három családba sorolhatók a protein foszfatázok: a foszfoprotein foszfatáz (PPP), fémion-függő protein foszfatázok (PPM) és a foszfortirozin- és kettős specificitású protein foszfatázok (PTP) osztályába. A protein foszfatáz 2A, 2B (PP2A és PP2B) és protein foszfatáz 1 (PP1) katalitikus alegységeinek aminosavszekvenciája hasonló, míg a protein foszfatáz 2C (PP2C) egészen eltérő szekvenciájú. A PP2A, PP2B, PP1 a foszfoprotein foszfatázok csoportjába, míg a PP2C a PPM csoportba tartozik. A PP2C kivételével minden foszfatáz oligomer formában létezik, a katalitikus alegység és egy vagy több kiegészítő alegység komplexeként.

A protein foszfatáz 1

A PP1 az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje, a Ser/Thr specifikus foszfatázok egyik legjelentősebb képviselője, mely szinte valamennyi eddig vizsgált sejt típusban expresszálódik. Széles szubsztrátspecificitásának köszönhetően kiemelkedően fontos szerepet játszik számos élettani folyamatban, mint például a sejt ciklusban, fehérje szintézisben és apoptózisban. A PP1 katalitikus alegységnek három izoformája ismert: PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ .

A katalitikus alegység önmagában számos fehérje defoszforilációját képes katalizálni, a sejtekben azonban regulátor alegységekkel alkot holoenzimet. Ezen regulátor alegységek szabályozzák a holoenzim aktivitását, a katalitikus alegységet a célfehérjékhez irányítják, szabályozzák a szubsztrátspecificitást. A katalitikus és regulátor alegység közötti kölcsönhatás ezért fontos szerepet játszik a PP1 működésében. A több mint 50 regulátor mindegyikben megtalálható egy (R/K)V α F konszenzus PP1c-kötő motívum, amelyben az x bármilyen aminosavat jelölhet.

A protein foszfatáz 2A

A PP2A szerkezetileg egy igen változatos felépítésű heterotrimer enzim. A sokféleség következménye, hogy a PP2A számos biológiai folyamatban vesz részt, többek között a sejtciklusban, a növekedésben, a hősokk folyamatban, a jelátvitelben, a sejtranszformációban, a DNS replikációban vagy például az apoptózisban. A PP2A trimer egy katalitikus alegység és két regulátor - PR65 (vagy A) és egy B - alegység komplexéből áll.

A katalitikus alegység (PP2Ac) két izoformája (α és β) ismert emlős szövetekben. A korai embrionális fejlődési szakaszban a két izoforma mind sejten belüli lokalizációja, mind expressziós szinten különbözik egymástól, katalitikus aktivitásuk azonban megegyezik. A katalitikus alegység expressziója autoregulációval szabályozott folyamat, ami a fehérje mennyiségét állandó szinten tartja.

A PR65 vagy A alegység szerkezeti funkcióval bír, erősen kötődik a katalitikus alegységhez. Ez a dimer az enzim váza, melyhez kapcsolódik a változatos harmadik, B alegység. Emlősökben az A alegység két izoformáját azonosították, melyek 86%-ban homológok. Az A alegység más sejtfehérjékkel kapcsolódva, a PP2A-t speciális jelátviteli útvonalak szabályozásába vonja be. A B alegység hiányában szabályozó szerepet tölt be a katalitikus alegység szubsztrátspecifitásának módosításával. A fehérje kristályszerkezetéről nyert adatok megerősítik azt a korábbi feltételezést, hogy a fehérje harmadlagos szerkezete aszimmetrikus és elnyújtott C betűre hasonlít.

A három alegységű holoenzim harmadik komponense többféle molekulatömegű formában előforduló polipeptid, melyet általánosan B alegységnek neveznek. A B alegységen belül 4 alcsaládot különítettek el, melyeket B, B', B'', B'''-kel jelöltek. Az egyes alcsaládok nem mutatnak egymással sem szerkezeti, sem pedig funkcióbeli hasonlóságot. A változatosságot tovább növeli, hogy az alcsaládokon belül több izoforma is található. A különféle B alegységek a PP2A holoenzimek szubsztrátspecifitását és a sejten belüli lokalizációját határozzák meg. Minden egyes B alcsaládba tartozó fehérje tartalmaz egy erősen konzervatív régiót (80% azonosság), ami a fehérje középső részére esik, míg a C- és N-végződésük különbözőek. A konzervatív régiók az A és C alegységgel való kötődésben játszanak szerepet, míg a különböző végek a funkcióbeli változatosságot növelik.

A reverzibilis fehérje foszforiláció szerepe az endotél citoszkeleton szabályozásában

A citoszkeleton gyors és flexibilis változása számos folyamat meghatározó eleme, mint például a sejt mozgása vagy a sejtosztódás. A citoskeletális és citoszkeleton asszociált fehérjék reverzibilis foszforilációja kulcsfontosságú a citoszkeleton átrendeződésében és az endotél barrier szabályozásában.

A miozin könnyűlánc (MLC20) Ser19 oldalláncán történő foszforilációja a sejtek kontrakcióját, stresszkábelek képződését és a sejtek közötti rések megjelenését eredményezi. A foszforilációt elsősorban a nagy molekulatömegű (210 kDa) Ca^{2+} -kalmodulin függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) katalizálja, mely nagymértékben homológ a simaizom MLCK-val. Az endotél sejtekben az MLC20 defoszforilációját az egyes típusú miozin foszfatáz katalizálja. A thrombin proteáz aktivált receptor-1-hez való kötődése az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésével jár, melynek következtében a kalcium-kalmodulin komplex kötődése aktiválja a MLC20 foszforilációját katalizáló MLCK-t. Emellett a Rho/Rho-kináz útvonal aktiválásával a miozin foszfatáz gátlása szintén az MLC20 foszforilációs szintjét növeli.

Miozin foszfatáz (MP)

A miozin foszfatáz az endotél barrier funkciójának egy kulcsfontosságú szabályozója. Az eredetileg csirke zúzából izolált holoenzim három alegységből áll. A katalitikus alegységhez (PP1c δ izoformája) további két regulátor alegység kötődik, a 130kDa-os miozinhoz is kötődő alegység (MBS) és egy kisebb, 20 kDa alegység (M20). Az MBS-t másnéven MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) alegységnek is nevezik. A MYPT1 két izoformáját (110 kDa és 130 kDa) ugyanaz a gén kódolja. Számos szövetben expresszálódik, legnagyobb mennyiségben a simaizomban mutatták ki. A MYPT1 az N-terminális részén található PP1c-kötő motívummal kötődik a PP1-hez és a C-terminális részén köti az M20 alegységet. Szekvenciájában található továbbá két nukleáris lokalizációs szignál és hét ankirin ismétlődés.

A TIMAP fehérje

A TIMAP (TGF β -inhibited membrane associated protein) fehérjét glomerulális endotél sejtekben írták le először reprezentációs differenciál analízis során. Expresszós szintje más sejtípusokhoz viszonyítva igen magas az endotél és hematopoetikus sejtekben. Patkány

szöveteken végzett immunhisztokémiás festésekkel igazolták, hogy a vaszkuláris endotéliumban található legnagyobb mennyiségben. Szerkezeti sajátosságai alapján a MYPT fehérje családba sorolják, ezen belül is a MYPT3 fehérjével mutat nagyfokú homológiát. A fehérje C-terminális részén található a prenilációjáért felelős CAAX-box motívum, mely a membránlokalizációt teszi lehetővé. N-terminálisán tartalmaz egy potenciális nukleáris lokalizációs szignált, ennek megfelelően vaszkuláris endotél sejtek magjában is megtalálható a fehérje, azonban ennek jelentősége még nem ismert.

Adaptor fehérjék

Az extracelluláris jelek sejten belüli továbbításához számos jelátviteli útvonal összehangolt működése szükséges, mely folyamatban fontos szerepet játszanak az ún. adaptor vagy állványfehérjék. A sejt felszíni receptorokon keresztüli jel sejten belüli folyamatokat indíthat el (pl. foszforiláció), ezáltal a kötődő fehérjepartnerek szubcelluláris kompartmentekből való átrendeződését fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül. Általánosan elmondható, hogy az adaptor fehérjék enzimatikusan inaktívak, azonban a hozzájuk kötődő jelátviteli enzimek aktivitását alapvető módon befolyásolják. Az enzimszubsztrát kötés térbeli lokalizációját szabályozva az egyes jelpályák integrálásában kitüntetett szerepük van. Variábilis doménjeik révén több fehérjét képesek akár egyszerre is megkötni, ezáltal multimolekuláris jelátviteli komplexeket alkotni.

Az NHERF1/EBP50 adaptor fehérje

Az NHERF (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor) adaptor fehérjecsald négy, PDZ (postsynaptic density 95/discs-large/zona occludens-1) domént tartalmazó fehérjéből áll: NHERF1/EBP50, NHERF2/E3KARP, NHERF3/PDZK1 és NHERF4/IKEPP. Az NHERF1-et elsődlegesen az NHE3 (Na^+/H^+ exchanger) regulátoraként azonosították epitél sejtekben, mely sejt típusban magas expressziós szinttel rendelkezik, ebből adódóan főleg ebben a sejt típusban vizsgálták. Később, szerepét az ERM (ezrin/radixin/moezin) fehérjék kötésében is leírták, erre utal a fehérje másik elnevezése, EBP50 (ERM binding phosphoprotein of 50 kDa).

Az EBP50 két PDZ-domént és egy C-terminális ERM-kötő régiót is tartalmaz, mely doménekkal a plazmamembrán és citoszkeleton elemei között teremt kapcsolatot. A legtöbb leírt kölcsönható partner az első PDZ doménon keresztül kötődik, míg néhány a második PDZ doménnel asszociál. A család tagjai a PDZ doméneken keresztül önmagukkal és egymással is képesek kölcsönhatni.

Számos kináz képes az EBP50 fehérjét foszforilálni, mely megváltoztatja a fehérje asszociációs képességeit. A mitózis során a ciklin dependens kináz 1 (Cdk1) a Ser279 és Ser301 oldalláncokat foszforilálja, mely gátolja az oligomerizációt, elősegíti azonban a peptidilprolil izomerázzal való asszociációját.

A reverzibilis fehérje foszforiláció részeként a fent említett helyek defoszforilációja nagy jelentőséggel bír, azonban az ezt a folyamatot katalizáló enzimeket még nem vizsgálták.

A RACK1 adaptor fehérje

A RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) fehérje szerkezetében hét WD domén van jelen, melyek hét-lapátos propeller szerkezetbe rendeződnek. Szerkezetéből adódóan a RACK1 többszörös fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására képes. A RACK1 számos transzmembrán receptorral kölcsönhat, mint például az inzulinszerű növekedési faktor-1 receptorral, β -integrin és androgén receptorral, valamint számos ion csatornával. Szerepét számos jelátviteli útvonalban leírták.

Nemrégiben a RACK1 fehérjét a 40S riboszómális alegység fő komponenseként azonosították. A feji régió közelében helyezkedik el, fizikai összeköttetést biztosítva az eukarióta riboszóma és a jelátviteli útvonalak között.

Célkitűzések

A tüdő működésében meghatározó jelentőségű a vaszkuláris endotél sejtek citoskeleton szerkezete és az endotél barrier/gát funkció. A vaszkuláris permeabilitás szignifikáns és hosszan tartó megemelkedése az akut gyulladással járó betegségek egyik legfőbb tünete. Az endotél barrier funkció mechanizmusának megismerésére irányuló kutatások ezen folyamatok összetett jelátviteli folyamatokon keresztül történő szabályozását igazolták, amelyekről ismereteink még hiányosak. Az ERM fehérje család tagjai a membránhoz asszociálódnak és a kortikális régió specifikus doménjeinek szerkezetét és funkcióját szabályozzák, közvetlenül vagy adaptor fehérjéken keresztül az aktin filamentumokat a plazma membránhoz kapcsolják. Egy adaptor foszfofehérjéről, az EBP50-ről kimutatták, hogy epitél sejtekben kölcsönhat az ERM fehérjékkel, azonban szerepét az endotéliumban még nem vizsgálták.

A TIMAP fehérje a protein foszfatáz 1 regulátoraként részt vesz az ERM (ezrin, radixin, moezin) fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában tüdő endotél sejtekben. A fehérje expressziós szintje más sejttípusokhoz viszonyítva endotél sejtekben igen magas. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a TIMAP fehérje pozitív szerepet tölt be az endotél barrier funkció fenntartásában. A fehérje endotél sejtekben betöltött pontos szerepéről és kölcsönható partnereiről keveset tudunk.

A fentiek alapján munkánk alapvető célkitűzéseit illetve vizsgálni kívánt kérdéseit két csoportra osztottuk: az EBP50 fehérje vizsgálata (A rész) és a TIMAP fehérje új kölcsönható partnerének azonosítása (B rész).

A:

- az EBP50 fehérje kimutatása endotél sejtekben és a fehérje foszforilációjának igazolása
- a foszforiláció hatásának vizsgálata a fehérje lokalizációjára
- a defoszforilációban szerepet játszó foszfatáz azonosítása

B:

- a TIMAP egy új kölcsönható partnerének azonosítása
- a fehérje kölcsönhatás szerkezeti elemzése
- a kölcsönhatás fiziológia szerepének feltárása

Anyagok és módszerek

Sejtek tenyésztése

A kísérleteinkhez felhasznált marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) a 8. passzálásnál szereztük be az American Type Tissue Culture Collectiontól (sejtvonal CC1-209), és 15-22 passzálásig használtuk fel az irodalmi hivatkozásban leírtaknak megfelelően. A sejteket 10% hőinaktivált FBS, 1% nem esszenciális aminosav és 1% Na-piruvát tartalmú (komplett) MEM médiumban tenyésztettük. A humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) (sejtvonal: CC-2530) a 3. passzálásnál szereztük be a Lonzától (Switzerland) és a gyártó által javasolt EGM-2 SingleQuots növekedési faktorokkal kiegészített EGM-2 Endothelial Cell Growth médiumban tenyésztettük. Az MCF7 sejtek (kat. szám: 86012803) a 11. passzálásnál szereztük be a European Collection of Cell Cultures (ECACC) (Salisbury, UK) cégtől és komplett MEM médiumban tenyésztettük. A HeLa sejteket (kat. szám: 93021013) szintén az ECACC-től szereztük be a 4. passzálásnál, majd 10% hőinaktivált FBS-t és 1% nem esszenciális aminosavat tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük.

Sejtek szinkronizálása

A marha tüdő artéria endotél sejteket kettős timidin blokkal szinkronizáltuk G1/S fázisban. A sejteket 16 órán keresztül 2mM timidin tartalmú tápoldatban tartottuk, majd médiumot cseréltünk és 8 órán keresztül komplett médiumban tenyésztettük. Az első blokk után a teljes G1/S blokkot 16 órán keresztül 2mM timidin tartalmú tápoldatban való kezeléssel kaptuk. A sejteket a G2/M fázisban való szinkronizációhoz 80 ng/ml nokodazollal kezeltük 14-16 órán át.

Transzfekció

Az endotél sejteket 80% konfluencia eléréséig szövettényesztő edényekben tenyésztettük, majd inkubáltuk az EBP50 vad típusú és mutáns konstruktjaival FuGENE HD transzfekciós reagens (Roche, South San Francisco, CA) jelenlétében. A HeLa sejteket szintén 80%-os konfluencia eléréséig növesztettük, majd Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) transzfekciós reagens és a pEGFP-C1, pEGFP-C1 TIMAP WT illetve a pEGFP-C1 TIMAP Δ p1c plazmidok elegyével inkubáltuk a gyártó leírása szerint.

Reverz transzkripció (RT) és polimeráz láncreakció (PCR)

A sejtekből totál RNS-t izoláltunk ZR RNA MicroPrep (Zymo Research Corporation, CA) kit felhasználásával. A reverz transzkripció közeg egyszeres RT pufferben a következőket tartalmazta: 2µg RNS, 0,111 µM oligo-dT primer, 5 mM dNTP és 200 U M-MLV RT. A reakcióközeget 37°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd PCR reakcióban használtuk feltemplátként.

A PCR reakcióhoz a nagy szöveghűségű Phusion illetve Phire Hot Start (Finnzymes) enzimeket használtuk fel. Az EBP50 (SLC9A3R1, NM_001077852), TIMAP (PPP1R16B, NM_015568) és RACK1 (GNB2L1, NM_006098.4) kódoló régióját specifikus primer párok segítségével sokszorosítottuk, majd a restrikciós helyek felhasználásával a megfelelő vektorokba szubklónoztuk és *E.coli* sejtekbe transzformáltuk.

Transzformálás

A kompetens sejteket jégen felolvasztottuk, majd a plazmidokat 100µl sejthez hozzáadtuk és 30 percig jégen inkubáltuk. 45 sec-ig hősokkot alkalmaztunk (42°C), majd 2 percre újra jégre helyeztük a mintákat. A sejtekhez 900 µl SOC médiumot adtunk és 37°C-on, 180 rpm-en, 45 percig rázattuk. A transzformált sejteket antibiotikum tartalmú LB agar táptalajra szélesztettük. A kontrollként szolgáló, konstruktot nem tartalmazó szuszpenziót antibiotikumot tartalmazó illetve nem tartalmazó lemezekre is kiszélesztettük. Az LB agar lemezeket 16 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

Plazmid preparálás

A plazmid DNS-t tartalmazó baktérium egy telepét megfelelő antibiotikum tartalmú LB táptalajba oltottuk le és egy éjszakán át 37°C-on, 180 rpm-en rázattuk. A GeneJET mini plazmid preparáló kitet (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) használtuk. Nagyobb mennyiségű plazmid tisztításához az előtenyészetet 100x-ra hígítottuk, egy éjszakán át 37°C-on, 180 rpm-en rázattuk és a GeneJET maxi plazmidpreparáló kitet (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) használtuk fel.

Immunfluoreszcencia és mikroszkópia

A sejteket 0,2 % zselatinnal előkezelt üveg fedőlemezekre tenyésztettük. Mosás után, 3,7% paraformaldehidet tartalmazó PBS-sel fixáltuk 15 percig, szobahőmérsékleten. Minden lépést

követően 3x mostuk a fedőlemezeket 1xPBS oldattal. A mintákat 0,5% Triton X-100 tartalmú PBS oldattal permeabilizáltuk 15 percig, majd 2% BSA-t tartalmazó PBS-sel blokkoltunk 30 percig. Az antitesteket blokkoló oldatban hígítottuk és a fedőlemezeket 1 órán keresztül inkubáltuk az elsődleges, majd 30 percen keresztül a másodlagos antitestekkel, sötétben. A fedőlemezeket ProLong Gold Antifade médium segítségével tárgylemezre rögzítettük. A képeket Carl Zeiss Axioskope-20 mikroszkóppal (Zeiss Plan-NEC FLUAR 636 1.25 NA olaj immerziós objektív) rögzítettük. A konfokális felvételeket Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal vettük föl.

Immunprecipitáció

A 10 cm átmérőjű szövettenyésztő edényben lévő sejteket háromszor mostuk 1xPBS-sel, majd 600µl immunprecipitációs (IP) pufferrel (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM nátrium vanadát, 1% NP-40) tártuk fel. Centrifugálás után a felülúszóhoz a nonspecifikus kötődés elkerülése végett 50 µl protein G Sepharose-t (GE Healthcare) adtunk és 4°C-on 3 órán keresztül finoman kevertettük. A protein G Sepharose-t centrifugálással eltávolítottuk, majd a felülúszót a megfelelő antitesttel inkubáltuk 4°C-on 1 óráig. Ehhez 60µl friss protein G Sepharose-t adtunk és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A mintákat háromszor mostuk 500µl IP pufferrel, majd 1xSDS mintapufferben főztük 5 percig, centrifugáltuk és a felülúszót SDS-PAGE, Western blot kísérletekben használtuk fel.

Sejtfractionálás

A sejtek citoplazma és sejtmag frakcióinak előállítását a ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a protokollban leírtak szerint végeztük. A sejteket 0,01M DTT-t és proteáz inhibitor tartalmazó sejt lízis pufferben gyűjtöttük szuszpendáltuk, majd 10 percig jégen tartottuk. A citoplazma frakciót (CP1) centrifugálás után kaptuk (500 g, 7 perc), amit tovább tisztítottunk (13 000 g, 15 perc) (CP2). A mag frakciót (N) az első centrifugálásból kapott pellet kétszeri mosása után kaptuk. A frakcionálás hatékonyságát immunoblottal ellenőriztük, β-tubulin antitestet használtunk citoplazma markerként, míg lamin A/C antitestet magi markerként.

A membrán frakció kinyeréséhez a ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit-et (Thermo Scientific) használtuk a gyártó által ajánlott leírásnak megfelelően. A membrán frakció tisztaságát CD31 antitesttel ellenőriztük.

siRNS transzfekció

A SMARTpool siRNS-t (L-006876-00-0 HumanGNB2L1, L-004065-00-0 HumanPP1R16B) illetve a kontroll siRNS-t (ON-TARGETplus siCONTROL nontargeting pool, D-001810-10-01-05) DharmaFECT-4 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham) transzfekciós reagenssel mértük össze a gyártó ajánlása szerint. 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a komplexeket a szérummentes médiumban lévő sejtekhez adtuk. 6 óra elteltével a médiumot komplett médiumra cseréltük. A sejteket 72 óra elteltével használtuk fel.

SDS-PAGE és Western blot

A sejtek molekulatömeg szerinti elválasztását 10-15% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. Az elektroforézist követően az elválasztott fehérjéket 0.45 µm pórusméretű Hybond ECL nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Piscataway, NJ) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% tejport tartalmazó TBST oldattal blokkoltuk, majd a primer és szekunder antitesttel 1 órán keresztül inkubáltuk. Az egyes lépések között a membránt háromszor 10 percig TBST-vel mostuk. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk röntgenfilmen (Kodak Medical X-ray Developer), vagy Alpha Innotech FluorChem FC2 Imager rendszer segítségével.

GST-pull down

A GST-taggel fuzionált fehérjéket tartalmazó baktériumokat 600 µl hideg lízis pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Tween 20, 0.2%, 2-mercaptoetanol, proteáz inhibitorok) szonikáltuk kétszer 45 sec-ig. A lizátumot 12 000 g-n, 15 percig fugáltuk, majd a felülúszóhoz 50 µl glutation Sepharose 4B-t adtunk, és 4°C-on lassú forgatás mellett immobilizáltuk a fehérjéket. A nem kötődő fehérjék eltávolítása végett a gyantát háromszor mostuk PBS-sel. Az endotél sejteket 600 µl hideg lízis pufferben felkapartuk, szonikáltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszót a Sepharose-on immobilizált fehérjékhez adtuk, majd 2-6 órán át hidegben forgattuk. A Sepharose-t háromszor mostuk PBS-sel, majd 1xSDS mintapufferrel főztük.

ECIS mérések és in vitro sebgyógyulási assay

Az endotél sejtek barrier funkciójának, sebgyógyulási képességének illetve a sejtek migratórikus képességének mérésére nagy érzékenységű, nem invazív biofizikai módszert választottunk (Electric cell substrate impedance sensing system, model Z, Applied BioPhysics Inc. Troy, NY) és az irodalmi hivatkozásoknak megfelelően használtuk. A sejteket arany elektróddal ellátott szövettenyésztő edényekben (8W10E típusú array) tenyésztettük és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk. A sejtek kitapadásával az ellenállás megnő, azonban ha a sejtek elvesztik adhéziós képességüket, vagy alakváltozásuk a barrier funkció sérülésével jár, az ellenállás lecsökken. A rendszer képes ezen folyamatokat valós időben követni, így a sejtek barrier formáló képességének monitorozására is alkalmas. A totál elektromos ellenállást a teljes monolayeren keresztül mértük a kitapadó sejtek felszíne és az arany elektródok közötti ellenállás meghatározásával.

Az ECIS rendszer alkalmas a sejtek sebgyógyulási képességének mérésére. A mérő elektród felszínére nőtt sejteken egyszeri magas elektromos impulzust alkalmazunk (5 mA, 60 kHz, 30 sec), a sejtek a sérülés következtében elhalnak, az ellenállás ezáltal lecsökken. Megindul a sejtosztódás valamint a környező sejtek vándorlása a sérült területre, így az ellenállás nőni kezd, míg az új monolayer ki nem alakul.

Statisztikai analízis

A Pearson koefficiensek kiértékelése SigmaStat programmal ANOVA analízissel történt. A statisztikai eltérést Dunn-módszerrel határoztuk meg ($P < 0,05$). Az immunoblottok denzitometrálnálása Image J szoftverrel történt.

Eredmények és megbeszélés

Az EBP50 fehérje sejtmagi lokalizációja endotél sejtekben

Az EBP50 fehérjéről epitél sejtekben számos adat áll rendelkezésre, más sejtípusokban szerepéről azonban keveset tudunk. A vese, máj, vékonybél és méhlepény sejtjeiben magas expressziós szinttel rendelkezik, de kisebb mennyiségben jelen van azonban az agyban és tüdőben is. Az epitél sejtekben a fehérjét a citoplazma és a plazmamembrán régióban detektálták. Munkánk során interfázisban lévő endotél sejteknél (BPAEC, HUVEC) immunfluoreszcens festéssel az EBP50-t sejtmagi és perinukleáris régióban detektáltuk, szemben az epitél sejteknél talált citoplazmatikus megjelenéssel. Eredményeinket sejtfractionálással, továbbá rekombináns fehérje expresszióval is alátámasztottuk.

Az EBP50 lokalizációja foszforiláció-függő módon változik

Immunfluoreszcens kísérleteink során megfigyeltük, hogy míg az EBP50 fehérje az interfázisban lévő endotél sejtekben a sejtmagban volt található, a mitózis során a profázistól a citokinezisig citoplazmatikus megjelenést mutatott. Irodalmi adatokból ismert volt, hogy a Cdk1 képes foszforilálni az EBP50 fehérjét két Ser oldalláncon epitél sejtekben a mitózis során, mely foszforiláció a fehérje látszólagos molekulatömegének megváltozásával detektálható Western blot kísérletben. Eredményeink alapján a fehérje sejten belüli lokalizáció változása a profázisban történik. Az EBP50 foszforilációjának igazolásához az endotél sejteket nokodazol kezeléssel G2/M fázisban szinkronizáltuk, majd a sejtlyátumokkal Western blot kísérletet végeztünk, amivel a fehérje foszforilációját detektálni tudtuk. Annak eldöntése érdekében, hogy a lokalizáció változás foszforiláció-függő módon történik-e, az EBP50 foszforilált formáját utánzó mutánsát állítottuk elő, amelyben a két érintett Ser oldalláncot savas jellegű aszparaginsavra cseréltük. Az overexpresszált mutáns fehérje a sejtekben citoplazmatikus megjelenést mutatott, míg a vad típusú rekombináns a sejtmagban volt detektálható.

Az EBP50 fehérje kölcsönhat a PP2A-B α holoenzimmel

Mivel a fehérje foszforiláció/defoszforiláció reverzibilis folyamat, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy mely Ser/Thr protein foszfatáz játszhat szerepet az EBP50 defoszforilációjában. G1/S, valamint G2/M fázisban szinkronizált endotél sejt kultúrából immunprecipitáltuk az EBP50 fehérjét. Az immunprecipitátumban Western blot kísérletben specifikus kölcsönhatást mutattunk ki a protein foszfatáz 2A (PP2A) fehérje A regulátor és C katalitikus alegységével, nem találtunk azonban kölcsönhatást a protein foszfatáz 1 enzimmel. Pull down kísérletben a PP2A holoenzim harmadik, B α alegységét is sikerült azonosítanunk. Immunfluoreszcens kísérletben a PP2A és EBP50 fehérje kolokalizációját találtuk a mitózis során a profázistól a citokinezis korai szakaszáig. Eredményeink alapján az EBP50 jelentős szerepet játszhat az endotél sejtekben a sejtciklus során, valamint a mitózisban foszforilált EBP50 kölcsönhat a PP2A holoenzimmel, így feltételezhető, hogy ez a foszfatáz defoszforilálja a fehérjét.

Új TIMAP-PP1c kölcsönható partner azonosítása

A TIMAP fehérje új kölcsönható partnerének azonosításához, bakteriálisan expresszált GST-TIMAP-ot használtunk fel pull down kísérletben. MS/MS tömegspektrometriás méréssel a RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) fehérjét, mint új kölcsönható partnert azonosítottuk. A fehérjék kölcsönhatását endogén rendszerben immunprecipitációval igazoltuk. TIMAP deplécióval, valamint emlős expressziós konstrukciókkal kimutattuk, hogy a komplexben jelen van a protein foszfatáz 1 (PP1) enzim is, azonban a RACK1 fehérjével való kölcsönhatása nem közvetlen, hanem a TIMAP fehérjén keresztül valósul meg. A kölcsönható domének feltárása érdekében számos szerkezeti mutánst hoztunk létre, majd a kölcsönhatást pull down módszerrel vizsgáltuk. Eredményeink alapján a TIMAP nukleáris lokalizációs szignálja, valamint C-terminális (aminosav 291-564) régiója, míg a RACK1 1-4 WD doménje érintett a kölcsönhatásban.

A cAMP/PKA útvonal aktiválásának hatása a TIMAP lokalizációjára és a RACK1-TIMAP kölcsönhatásra

Mind a TIMAP, mind a RACK1 foszforilációja ismert volt az irodalomból, ezért következő lépésben megvizsgáltuk a foszforiláció hatását a fehérje kölcsönhatásra. Pull down és immunprecipitációs kísérletekben is azt találtuk, hogy míg a RACK1 foszforiláció (PKC aktiválás) nem befolyásolta a kölcsönhatást, addig a TIMAP foszforilációja (cAMP/PKA útvonal aktiválásán keresztül) gyengítette a két fehérje asszociációját. Immunfluoreszcens kísérletekben kimutattuk, hogy a TIMAP a cAMP/PKA aktiválás/foszforiláció hatására feldúsult a membrán régióban, míg a RACK1 lokalizációja nem változott. Ezeket az eredményeket sejtfractionálással is igazoltuk.

Valószínűsíthető, hogy a foszforiláció okozta konformáció változás következtében a két fehérje közti kölcsönhatás legyengül, lehetővé téve ezáltal más fehérjékkel való asszociációjukat.

A RACK1 elősegíti a TIMAP fehérje membránhoz történő lokalizációját

Az endotél sejteket RACK1 specifikus siRNS segítségével depletáltuk, majd a csendesítés sikerességét mind mRNS szinten RT-PCR-rel, mind fehérje szinten Western blottal igazoltuk. Immunfluoreszcens festéssel és a csendesített sejtek membránfrakciójának vizsgálatával megfigyeltük, hogy a TIMAP fehérje szintje a RACK1 depletált sejtekben lecsökkent a membránban. Mindezek mellett ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) mérésekben a csendesített sejtek letapadási és barrier formáló képessége is gyengült, valamint a barrier fokozó bioaktív ágensekkel történő kezelése során a maximális hatás elmaradt a normál sejtek válaszához képest.

A TIMAP membrán lokalizációját a fehérje C-terminális részén található prenilációs motívum teszi lehetővé. A RACK1 fehérje egy új kölcsönható partnereként azonosítottuk a farnezil-transzferáz enzimet, mely a prenilációt végzi. Eredményeink alapján a RACK1, mint adaptor fehérje biztosítja a TIMAP és a farnezil-transzferáz közötti kölcsönhatást, lehetővé téve ezáltal a prenilációt. Ezt támasztja alá az, hogy a RACK1 depletált sejtekben a TIMAP fehérje kölcsönhatása a farnezil-transzferázzal nem mutatható ki és nem jelenik meg a membránban, ami a preniláció hiányára utal.

Összefoglalás

A vaszkuláris endotél sejtek szemiszelektív barrierként választják el a keringő vért a környező szövetektől. A jól működő endotél barrier funkció fenntartásában számos citoskeletális és citoskeleton asszociált fehérje foszforilációja fontos szerepet játszik. Az EBP50 (ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50), egy olyan foszforilálható adaptor fehérje, mely epitel sejtekben magas expressziós szinttel rendelkezik azonban endotél sejtekben még nem vizsgálták. Immunfluoreszcens festéssel, valamint sejtfractionálással az EBP50 fehérjét az interfázisban lévő endotél sejtek magi régiójában detektáltuk. A mitózis profázisában foszforiláció-függő módon a sejtek citoplazmájába transzlokálódott és kolokalizáció volt megfigyelhető a protein foszfatáz 2A enzimmel. Az EBP50 foszforilációt utánzó mutánsát expresszáló sejtek gyorsabb *in vitro* sebgyógyulást mutattak, ami az EBP50 sejtosztódásban betöltött szabályozó szerepére utal. Immunprecipitációs és pull down kísérletekkel sikerült igazolnunk az EBP50 és a PP2A (A, C, és B α) alegységei közötti sejtciklus függő kölcsönhatást. Eredményeink arra utalnak, hogy a PP2A enzim szerepet játszik az EBP50 fehérje defoszforilálásában normál sejtekben a sejtciklus során.

A TIMAP (TGF β inhibited membrane-associated protein) endotél sejtekben rendelkezik a legmagasabb expressziós szinttel, szerepéről és kölcsönható partnereiről azonban csak keveset tudunk. A RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) adaptor fehérje, számos jelátviteli útvonalban játszik szerepet. Eredményeink alapján endotél sejtekben a RACK1 a TIMAP-PP1c komplexhez kötődik. A kölcsönhatásban a RACK1 WD1-4 doménjei vesznek részt, melyhez kötődik továbbá a farnezil-transzferáz enzim is. A cAMP/PKA útvonal aktiválásával elért TIMAP foszforiláció csökkentette a RACK1-TIMAP komplex mennyiségét, valamint a TIMAP membránban való feldúsulásához vezetett. A RACK1 depléciójával a TIMAP membránlokalizációja valamint a farnezil-transzferáz enzimmel való kölcsönhatása is megszűnt. Eredményeink alapján a RACK1 adaptor fehérje biztosítja a TIMAP prenilációját az ehhez szükséges farnezil-transzferáz enzimmel való kölcsönhatással.

Iktatószám: DEENKÉTK/171/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Boratkó Anita

Neptun kód: GIHJDJ

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Boratkó, A.**, Gergely, P., Csontos, C.: RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners.
Cell Commun Signal. 11 (2), 1-14, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1478-811X-11-2>
IF:5.5 (2011)
2. **Boratkó, A.**, Gergely, P., Csontos, C.: Cell cycle dependent association of EBP50 with protein phosphatase 2A in endothelial cells.
PLoS One. 7 (4), e35595, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035595>
IF:4.092 (2011)



További Közlemények

3. Szilágyi, O., **Boratkó, A.**, Panyi, G., Hajdú, P.: The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse.

Pflugers Arch. Epub ahead of print (2013)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-013-1256-6>

IF:4.463 (2011)

Összesített impakt faktor: 14.055

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 9.592

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.07



Konferencia előadások:

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: PP2A dephosphorylates ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 at the mitotic phase of the cell cycle, 2011, Signal transduction and skin biology: a training course, Galyatető

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: PP2A dephosphorylates ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 at the mitotic phase of the cell cycle, 2011, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen

Boratkó Anita, Gergely Pál, Csontos Csilla: EBP50/NHERF1 fehérje vizsgálata endotél sejtekben, 2011, A Magyar Biokémiai Egyesület 2011.évi Vándorgyűlése, Pécs

Boratkó Anita, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: NHERF1 és NHERF2 adaptor fehérjék szerepe tüdő endotél sejtekben, 2012, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: Adaptor proteins in the endothelium, 2012, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen

Konferencia poszterek:

Kása Anita, **Boratkó Anita**, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységek vizsgálata tüdőartéria endothel sejteken, 2008, A Magyar Biokémiai Egyesület 2008.évi Vándorgyűlése, Szeged

Boratkó Anita, Czikora István, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Csontos Csilla: Protein foszfatáz-1 katalitikus és regulátor alegységek expressziója és lokalizációja daganatos sejtekben, 2010, 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg

Boratkó Anita, Czikora István, Erdődi Ferenc, Gergely Pál, Csontos Csilla: A TIMAP és a protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének vizsgálata daganatos sejtekben, 2010, A Magyar Biokémiai Egyesület 2010.évi Vándorgyűlése, Budapest

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: PP2A dephosphorylates ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 at the mitotic phase of the cell cycle, 2011, Europhosphatases 2011, Baden, AUT

Orsolya Szilágyi, György Panyi, **Anita Boratkó**, Péter Hajdú. The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, 2011, IMMune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (IMPULSE), Visegrád

Orsolya Szilágyi, György Panyi, **Anita Boratkó**, Péter Hajdú. The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, San Diego, 2012, Biophysical Society 56th Annual Meeting, USA

Boratkó Anita, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: NHERF1 és NHERF2 adaptor fehérjék szerepe tüdő endotél sejtekben, 2012, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg

Orsolya Szilágyi, György Panyi, **Anita Boratkó**, Péter Hajdú: The possible role of PSD-95/SAP90 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse, 2012, 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: Characterization of NHERF1/NHERF2 proteins in endothelial cells, 2012, FEBS 3+ Meeting, Opatija, Croatia

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: Membrane localization of TIMAP is regulated by RACK1 adaptor protein via FPFT-1, 2012, The EMBO Meeting, Nice, France

Boratkó Anita, Gergely Pál, Csontos Csilla: A RACK-1 adaptor fehérje szerepe a TIMAP membrán lokalizációjának szabályozásában, 2012, A Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, Esztergom

Anita Boratkó, Pál Gergely, Csilla Csontos: Prenylation of TIMAP is regulated by RACK1 adaptor protein, 2012, PTMs in Cell Signaling, Copenhagen, Denmark

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 sz. projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 sz. projekt nyújtott támogatást. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



SZÉCHENYI TERV