

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Protein foszfatázok szerepe az endoteliális nitrogén-
monoxid szintáz és az endotél barrier funkció
szabályozásában**

Bátori Róbert Károly

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2018

Protein foszfatázok szerepe az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz és az endotél barrier funkció szabályozásában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Bátori Róbert Károly okleveles Biológus/Biotechnológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Erdődi Ferenc

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK
Élettani Intézet könyvtára
2015. december 16, 9:30 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Balla József, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD
Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2018 . december 4., 13:00 óra

BEVEZETÉS

A vaszkuláris endotélium

A vaszkuláris endotélium az erek belső falát borító, egy rétegben elhelyezkedő, egymáshoz -szorosan kapcsolódó endotél sejtekből (EC) áll. Egyik fő funkciója a szelektív barrier biztosítása a véráram és a környező szövetek között, ezáltal szabályozva a sejtek, folyadék és a nagy molekulatömegű anyagok vérerekből való kijutását. Az endotél sejtek e tulajdonságát áteresztőképességnek nevezzük. Az áteresztőképesség fenntartásához, több egyéb tényező mellett, endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) által termelt nitrogén-monoxid (NO) szükséges. Az eNOS aktivitása pedig, többek között, reverzibilis foszforiláció-defoszforiláció által szabályozható. Az endotél barrier funkciót az akto-miozin kontraktilis rendszer is befolyásolja, ezért a 20 kDa miozin könnyű lánc (MLC20) foszforilációs állapota az endotél barrier funkció egyik jellemzője. Gyulladás-keltő stimulusok hatására az endotél barrier funkció sérül, amely súlyos, gyakran halálos betegségekhez vezethet, ezért az endotél barrier funkció szabályozásában szerepet játszó folyamatok pontosabb megértése szükséges.

Az endotél barrier funkciójának szabályozása a fehérjék reverzibilis foszforiláció/defoszforilációja által

A reverzibilis fehérje foszforiláció az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás. A foszforilációt a protein kinázok katalizálják, mely során az ATP γ -foszfát csoportját a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncába építik be. A folyamat megfordíthatóságát a protein foszfatázok biztosítják a foszfo-észter kötés hidrolízise révén. Az emberi genom 518 protein kinázt kódol, amelyek a Ser/Thr-, Tyr- és kettős specificitású protein kinázok csoportjába tartoznak. A Ser/Thr típusú protein kinázok a sejtekben zajló fehérje foszforilációs folyamatok 98,2%-áért felelősek. Azonban a protein foszfatázok száma csupán mindössze 150-re tehető, és ebből mintegy 40 a P-Ser/Thr specifikus foszfatáz katalitikus alegységek száma. A protein foszfatáz katalitikus alegységek kisebb száma ellenére a regulátor alegységekkel való asszociáció révén nagy specificitás érhető el. A legújabb osztályozási szempontok alapján a foszfoprotein foszfatázok (PPP) hét alosztályba sorolhatók: a protein foszfatáz 1 (PP1), -2A, (PP2A) és -2B (PP2B, vagy calcineurin), valamint az új típusú protein foszfatázok, PP4, PP5, PP6 és PP7. Kísérleteink első részében a Ser/Thr specifikus protein foszfatázok eNOS és endotél barrier funkcióban betöltött szerepének tanulmányozásával

foglalkoztunk, ezért az alábbiakban a PP1 és PP2A protein foszfatázok jellemzőit szeretném összegezni.

PP1

A PP1 típusú foszfatáz holoenzimek egy 35-38 kDa molekulatömegű katalitikus alegységből (PP1c), valamint változatos regulátor alegységekből állnak, amelyek a szubsztrát-specifitásért felelősek. Emlősökben a PP1c-t három gén kódolja és öt splice variánsa ismert: PP1 α 1, PP1 α 2, PP1 γ 1, PP1 γ 2 és PP1 β/δ . A PP1c kompakt szerkezetű, melynek közepén egy β -szendvics, helyezkedik el. Az aktív centrum pedig az Y-alakú szubsztrát kötő árkok metszéspontjában helyezkedik el. Habár a PP1c önmagában is katalitikusan aktív, a szubsztrát-specifitása széles, amely a hozzá kapcsolódó regulátor alegységek fontosságára hívja fel a figyelmet. Jelenleg több mint 200 a PP1c katalitikus aktivitását befolyásoló, azzal funkcionális kölcsönhatást képző regulátor alegység ismert. Közös tulajdonságuk, hogy a PP1c-vel egy R/KVxF konszenzus szekvencia motívumon keresztül kapcsolódnak. Funkció szerint a regulátor alegységek három csoportba sorolhatók, eszerint: inhibitor-, célra irányító- (targeting) és szubsztrát kölcsönható partnereket különböztetünk meg. A regulátor alegységek közül a miozin foszfatáz (MP) célra irányító alegység (MYPT1) családba tartozó PP1c-vel kölcsönható partnereket részletesen jellemezték a simaizmokban, de a MYPT1 regulátor szerepéről a nem-izom sejtekben is egyre több információval rendelkezünk.

PP2A

A heterotrimer PP2A holoenzim egy 36 kDa molekulatömegű katalitikus alegységből (C), 65 kDa állvány alegységből (A) és egy variábilis regulátor alegységből (B) áll, de heterodimer formák is léteznek. Az A és C alegységek, amelyeknek két-két izoformája ismert emlős sejtekben (α és β), mindig egymással összekapcsolódva találhatóak meg, a heterotrimer forma központi vázát, az AC alegységet képezve. A regulátor B alegységek négy, egymástól szerkezetileg eltérő csoportba sorolhatók, amelyeket 3-5 rokon gén kódol. Ezek a B, B', B'' and B''' alegységek. A PP1-el ellentétben, sem a PP2A, sem pedig a PP2A-t kötő szubsztrátok szerkezetében nem azonosítottak speciális kötő motívumokat. Az AC alegység különböző regulátor alegységekkel való kombinációjának fontos szerepe van a szubsztrát valamint a PP2A katalitikus aktivitásának szabályozásában. A B' δ alegység PKA általi foszforilációja a Ser566 oldalláncon például növeli a holoenzim aktivitását.

A PP1 és PP2A aktivitásának szabályozása foszfatáz inhibitor toxinokkal

A legtöbb protein foszfatáz inhibitor membránpermeábilis és nem-szelektív. A PP1 és PP2A aktivitása egyaránt gátolható az okadánsav (OA), fosztricin, kantaridin, nodularin, kalikulin-A (CLA), tautomycin (TM) és mikrociszrin (MC-LR) által, koncentráció függő módon. A CLA és TM egyaránt gátolja a PP1-et és PP2A-t *in vitro*, azonban ezen toxinok foszfatázgátló hatása sejtes rendszerekben ellentmondásos. Kísérleteink során CLA-t (10nM) használtunk olyan koncentrációban, amely részleges, de szelektív PP2A-, valamint TM-t (1 μ M), amely főként PP1 gátlást okozott.

A miozin foszfatáz szerkezete, szabályozása és funkciója

A trimer szerkezetű miozin foszfatáz (MP) holoenzimet, amely egy ~38 kDa PP1c δ , egy 110-130 kDa MYPT1 (Myosin Phosphatase Target subunit 1) regulátor alegységből, valamint egy 20-21 kDa alegységből (M20) áll. A PP1c-kötő KVKF motívum a MYPT1 N-terminális régiójában található a 35-38 oldalláncok között, amelyet az N-terminális kar és 8 ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó motívum (39-296) övez. A MP holoenzim legfontosabb jellemzői a PP1c δ és MYPT1 alegységeknek tulajdoníthatóak. A MYPT1 regulátor alegységnek elsősorban a MP holoenzim szubsztrát specificitásának szabályozásában van fontos szerepe, a PP1 katalitikus alegységnek a foszfo-MLC (ppMLC20) szubsztrátra való célra irányítása által. Azonban a számos MYPT1-el kölcsönható partner léte a MP holoenzimnek a sejtes folyamatok szabályozásában betöltött szélesebb körű szerepére utal, mint csupán a ppMLC20 defoszforilációja.

A MP simaizomokban és endotél sejtekben történő szabályozása hasonló és számos módon történhet. Ezek közül . A MYPT1 Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³ oldalláncokon történő foszforilációja kitüntetett szereppel bír a sejtek kontraktilitásának szabályozásában. Mindkét oldallánc foszforilálható a Rho kináz (ROCK) által ami a MP holoenzim gátlását eredményezi. Azonban a MYPT1 PKA/PKG általi foszforilációja a szomszédos Ser oldalláncokon (Ser⁶⁹⁵ és Ser⁸⁵²), nagymértékben csökkenti a MYPT1 foszforilációját a Thr^{696/853} oldalláncokon. Ugyanakkor a MYPT1 kettős foszforilációját is leírták a Ser⁶⁹⁵/Thr⁶⁹⁶ és/vagy Ser⁸⁵²/Thr⁸⁵³ oldalláncokon, amelyet szintén a PKA/PKG katalizál, azonban ennek nincs jelentős hatása a MP katalitikus aktivitására. A Thr oldalláncok ROCK általi foszforilációja esetében megfigyelték, hogy a szomszédos Ser oldalláncok foszforilációja nem lehetséges így a Thr oldalláncok csak akkor foszforilálhatóak PKA/PKG által ha már a Ser oldalláncok foszforilálva vannak. A MP holoenzim aktivitása kölcsönható partnerek

által is szabályozható. A legfontosabb endogén gátló fehérje kis molekulatömegű (17 kDa) protein foszfatáz1 regulátor alegység 14A, más néven CPI-17, amely az inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjékkel ellentétben nem csak a PP1cδ alegység, hanem a MP holoenzim aktivitását is gátolja foszforiláció függő módon.

Az MLC20 foszforilációja a Ca^{2+} /kalmodulin függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) által a Ser¹⁹ és a Thr¹⁸ oldalláncokon, valamint a defoszforilációja a MP által alapvető szereppel bír az aktomiozin kontrakció szabályozásában, ami pedig kulcsfontosságú az endotél barrier funkció szabályozásában. Gyulladásokeltető ágensek (pl. hisztamin, bradikinin) hatására megnövekszik a MLCK aktivitása, ami az endotél sejtek permeabilitásának növekedését eredményezi. Ezzel szemben az extracelluláris purinok pl. adozin (Ado), adozin trifoszfát (ATP) vagy az ATPγS (egy nagyon lassan hidrolizáló ATP analóg) barrier védő szereppel bír a makrovaszkuláris EC-ben. A PKA/PKG közvetítette jelátviteli útvonal aktivációja ezen agonisták által a MYPT1 foszforilációját idézi elő a Ser⁶⁹⁵ és Ser⁸⁵² oldalláncokon ezáltal csökkentve a MP inaktivációját a MYPT1 ROCK általi foszforilációja következtében, ami MLC20 defoszforilációhoz és a sejtek relaxációjához vezet. Melanóma sejtekben szintén megfigyelték, hogy a zöld tea polifenol (-)-epigallokatekin-3-O-gallát (EGCG) a PP2A aktivációját idézte elő cAMP/PKA függő módon, ami a MYPT1 Thr^{P1696} defoszforilációját valamint idézte elő.

Az eNOS szerkezete, szabályozása és funkciója

A nitrogén-monoxid (NO) nagy diffúziós képességgel rendelkező, igen reaktív szabadgyök, amely biológiai rendszerekben viszonylag rövid (5 s) féléletidővel rendelkezik. A NO-ot a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzimek szintetizálják, amelyeknek három izoformájuk ismert: neuronális- (nNOS), indukálható- (iNOS) és endoteliális NOS (eNOS). Az eNOS konstitutívan expresszálódó enzim, amelyet főként az endotél sejtekben jelenik meg. A humán eNOS egy 133 kDa méretű enzim, amely egy N-terminális oxigenáz és egy C-terminális reduktáz doménnel rendelkezik. A NO termeléséhez két eNOS monomer fej-farok orientációban való dimerizációja szükséges. Az eNOS aktiváció szintén feltétele még az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése, amely a Ca^{2+} /CaM eNOS monomerekhez való kötődéséhez szükséges. Ugyanakkor az eNOS aktivitásának szabályozása aprólékosan kontrollált folyamat, amelyet számos mechanizmus által kontrollált transzkripció- (NFκB, KLF-2, HIF1 és HIF2), poszttranszkripció- (TNFα) és poszttranszlációs szinten. Az eNOS poszttranszlációs

szabályozásában kitüntetett szerepe van az enzim protein kinázok és foszfatázok általi módosításának a Ser, Thr és Tyr oldalláncokon. Mindezülig a humán eNOS szerkezetében hét fő foszforilációs helyet azonosítottak, amelyek közül a Ser1177 és Thr495 kitüntetett szereppel bír. Mindkét foszforilációs helyet több kináz foszforilálhatja. Az eNOS Ser117 oldalláncon történő foszforilációja a PKA által növeli az enzim katalitikus aktivitását, míg a Thr495 oldallánc ROCK vagy protein kináz C (PKC) általi foszforilációja gátolja azt. Endotél sejtekben PMA kezelés hatására PKC aktiváció következtében növekszik az eNOS Thr495 foszforilációja, valamint csökken a NO szintje.

Az eNOS és az általa termelt NO számos kardiovaszkuláris folyamat fontos regulátora. Az erekben, a NO legfontosabb biológiai funkciója a szolubilis guanilát cikláz (sGC) simaizmokban történő aktiválása, amely a cGMP szint növekedését eredményezi. Ennek következtében megemelkedik a cGMP függő PKG aktivitásának szintje, ami pedig a MP aktivációját és a simaizmok relaxációját eredményezi. A NO az endotél sejtek barrier funkcióját is befolyásolja. Kimutatták, hogy gyulladáskeltő ágensek pl. VEGF a NO szintjének növekedését eredményezik, amely hozzájárul az endotél sejtek permeabilitásának növekedéséhez. Ugyanakkor a NO képződés farmakológiai inhibitorokkal történő gátlása, vagy az eNOS gén csendesítése szintén az erek átteresztőképességének növekedéséhez vezet, az arteriólák, kapillárisok és posztkapilláris vénák szintjén. Más tanulmányok szerint az EGCG endotél barrier protektív szereppel bír *in vitro*, azonban a jelenség molekuláris háttere nem teljesen tisztázott.

CÉLKITŰZÉSEK

Az endotél barrier funkció és integritás szabályozásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokat az elmúlt évtizedek során intenzíven tanulmányozták, azonban a jelentős előrelépések ellenére ezek a folyamatok még nem teljesen tisztázottak. Az irodalmi áttekintésből is kitűnik, hogy az endotélium eredetű NO kulcsfontosságú szerepet játszik az erek számos funkciójának szabályozásában, beleértve az endotél sejtek permeabilitásában bekövetkező változásokat. Az eNOS foszforilációs szabályozásában bekövetkező zavarok, az eNOS expressziós szintjének csökkenése a NO szint csökkenésével jár, amely a kardiovaszkuláris betegségek tüneteinek súlyosbodásához vezet. Ezért az eNOS szabályozás jobb megértése és az eNOS funkció javítására irányuló új megközelítések fontos kutatási célok. Az eNOS Thr495 oldalláncon történő foszforilációja, negatív módon befolyásolja az enzim aktivitását. A Thr495 oldallánc foszforilációját számos kináz katalizálja, azonban a defoszforilációs folyamatok kevésbé ismertek. A ROCK foszforilálja az eNOS-t a Thr495 oldallánc, amelyet más ROCK szubsztrátokra nagyon hasonló aminosav szekvencia övez. Ismert, hogy a ROCK szubsztrátokat pedig gyakran a MP defoszforilálja, amely a MP eNOS^{pT495} oldallánc defoszforilációjában játszott potenciális szerepére utal. Ezért, korábbi eredményeink és az irodalmi adatok alapján célul tűztem ki:

1. A MP holoenzim szerepének vizsgálatát az eNOS Thr495 oldallánc defoszforilációjában, továbbá, az ebben szerepet játszó kölcsönhatások és jelátviteli folyamatok vizsgálatát, amelyek az eNOS gátlásában vagy aktiválásában illetve az endotél barrier funkció szabályozásában vehetnek részt.

Másrészt, az Ado és ATP γ S szintén fontos regulátorai az endotél homeosztázisnak, amelyek az endotél barrier funkciót is erősítik cAMP-függő és független módon, megnövekedett MP aktivitást és a MLC20 foszforilációs szintjének csökkenését idézve elő. Azonban az Ado és ATP γ S szerepe a mikrovaskuláris endotél sejtekben nem teljesen ismert, ezért következő célom volt:

2. Az Ado- és ATP γ S indukálta purinerg receptor mediált jelátviteli útvonalak feltárása és az általuk indukált barrier funkciót erősítő folyamatok vizsgálata a humán tüdő mikrovaskuláris endotél sejtekben (HLMVECs).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúrák

A humán köldökzsinór véna endotél sejteket (HUVEC) 20% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamin 0.25 µg/ml amphotericin B, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin tartalmú M199 oldatban tenyésztettük. Az azonos szervezetből származó sejteket a 4-7 passzálások között használtuk. A marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) a 17-23 passzálások között kerültek felhasználásra. a BPAE sejteket 10% (v/v) hőinaktivált FBS, 1 mM nátrium-piruvát, 0.1 mM nem-esszenciális aminosav oldat, 2 mM glutamine, 1% (v/v) antibiotikum-antimikotikum oldat tartalmú MEM oldatban tenyésztettük. A HLMVEC és humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) 5-10% (v/v) FBS, 0.2 ml hidrokortizon, 2 ml humán FGF-B, 0.5 ml VEGF, 0.5 ml R3-IGF-1, 0.5 ml aszkorbinsav, 0.5 ml EGF, 0.5 ml GA-1000 és 0.5 ml heparin tartalmú EBM2 tápfolyadékban tenyésztettük. A humán embrionális vese eredetű HEK293, eNOS knock-in HEK293, valamint tsA201 sejteket 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine és 1% (v/v) antibiotikum-antimikotikum oldatot tartalmazó DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A sejteket 37 °C hőmérsékletű, 5% CO₂-95% levegő vízgőz telített elegyét tartalmazó inkubátorban tenyésztettünk.

Immunoblot analízis

A mintákban lévő fehérjéket poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) technikával elválasztottuk majd 0.45 µM pórusméretű nitrocellulóz vagy 0.2 µM pórusméretű PVDF membránra transzfereltük 100 V feszültségen, 1.5 órán át. A membránokat 5 % (m/v) sovány tejport és 1% (v/v) Tween 20-at tartalmazó foszfát- (PBST) vagy Tris-pufferben (TBST) blokkoltuk, majd az elsődleges antitestet tartalmazó oldattal inkubáltuk (3 óra, 24 °C, vagy éjszakán át 4 °C-on). PBST vagy TBST pufferrel történő mosási lépést követően pedig a HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az immunoreaktív fehérjéket ECL módszerrel detektáltuk. A kemilumineszcens jelet FluorChem AIC készülékkel vagy pedig autoradiográfiával fényérzékeny filmen detektáltuk. A reprezentatív képeket Adobe Photoshop CS5 szoftver segítségével kivágtuk. A denzitometriás analízist ImageJ szoftver segítségével végeztük.

Transzfekció és géncsendesítés

A MYPT1 és/vagy eNOS fehérjéket tsA201 sejtekben overexpresszáltuk 60-70% konfluens kultúrákban. Külön csövekben 100-100 µl szérum mentes médiumban maximum 3 µg DNS-t (2 µg pcDNA3.1c-myc-eNOS plazmid, 1 µg pM11-FLAG-MYPT1, vagy mindkét expressziós

vektort együtt), vagy 12 µl PEI transzfekciós reagenst kevertünk, majd a reagenst tartalmazó cső tartalmát hozzáadtuk a DNS-t tartalmazó oldathoz és 30 perc inkubációt követően a sejtekre csepegtettük. A sejteket további 48 órán át inkubáltuk. Más kísérletekben az AKAP2-t és MYPT1-et HEK293 sejtekben 10 cm sejtenyészítő edényekben transzfektáltuk. 600 µl szérum mentes médiumban először 6 µg DNS-t, majd 18 µl X-tremeGENE™ HP transzfekciós reagenst kevertünk, szobahőn 25 percig inkubáltuk, majd a sejtekre csepegtettük 10% FBS-t tartalmazó médiumban. A sejteket további 48 órán át 37 °C-on inkubáltuk.

A gén csendesítési kísérletekhez 6 lyukú platekben BPAEC és HLMVEC sejteket használtunk és nem specifikus (kontrol), panPP1c, MYPT1, EPAC1, AKAP2, PKAα valamint P2Y receptor elleni siRNS-el transzfektáltuk 20-50 nM végkoncentrációban DharmaFect 2 vagy siPORT™ Amine transzfekciós reagensek felhasználásával a gyártók utasításai szerint. 6 óra inkubációt követően 20% FBS-t vagy pedig 5% FBS-t tartalmazó EBM2-t adtunk a sejtekhez amelyeket további 48-72 órán át inkubáltunk 37 °C-on.

Nitrogén-monoxid mérési kísérletek

A sejtenyészetek felülúszójának NO tartalmát Sievers NO Analyzer NOA 280i készülék segítségével mértük a gyártó utasításainak megfelelően. A kezelése során a sejtekben képződő NO a felülúszóba diffundál ahol az oldott oxigén jelenlétében nitritté alakul. A felülúszóban lévő fehérjéket 200 mM ZnSO₄-al kicsaptuk és centrifugálással elávolítottuk. Mindegyik mintából 100-100 µl-t injektáltunk a reakciókamrába, ahol a nitritből nátrium-jodid jelenlétében NO képződött, amely ózonnal való reakciója során gerjesztett állapotú nitrogén-dioxidá (NO₂^{*}) alakul. A NO₂^{*} emissziója a közeli infravörös tartományba esik. A kibocsátott fényt, amely egyenesen arányos a NO mennyiségével, foton sokszorozó csővel detektáltuk.

Nitrogén-monoxid mérése DAF-2 DA festéssel

A BPAE sejteket 13 mm átmérőjű fedőlemezekre szálesztettük 24 lyukú plétekben és 60-80 % konfluencia eléréséig tenyésztettük. Ezt követően a tenyésztőfolyadékot 1 µM β-NADH, arginin szubsztrát, 25 µM 4,5-diaminofluorescein diacetátot (DAF-2 DA) tartalmú reakciópufferre cseréltük és a sejteket 2 órán át inkubáltuk. Majd PMA vagy EGCG kezelést követően újabb 1 órán át inkubáltunk. Párhuzamos (kontroll) kísérletben a sejteket reakciópufferrel inkubáltuk. Inkubációt követően a sejteket PBS-el mostuk majd 4% (v/v) paraformaldehiddel (PFA) 10 percig

szobahőn fixáltuk. PBS-el történő újabb 3 mosási lépést követően a mintákat 4.3 (m/v) Mowiol-ban fedtük le és a sejteket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Pull-down kísérletek

A GST-MYPT1 pull-down kísérletekben GST (kontroll) valamint GST-MYPT1 kötöttünk glutation-szefarózzel, majd előtisztított HUVEC lizátumot tettünk a gyantára, majd 3 órán át kevertettük 4 °C-on. Ezt követően a gyantát háromszor mostuk, 10 percig főztük SDS mintapufferben, majd immunoblot analízist végeztünk eNOS antitest használatával.

A tsA201 sejtekben overexpresszált c-myc-eNOS és FLAG-MYPT1 fehérjék pull-down analíziséhez anti-c-myc és anti-FLAG M2 antitesteket kötöttünk EZview™ Red gélhez és a gyantáról lefőzött mintát anti-MYPT1, valamint anti-eNOS, illetve anti-c-myc és anti-FLAG antitestekkel vizsgáltuk.

***In vitro* foszforiláció/defoszforiláció analízis**

A c-myc-eNOS-t tsA201 sejtekben overexpresszáltuk, a sejteket lizáltuk és centrifugáltuk (10000 g, 10 perc), majd a felülúszót az anti-c-myc konjugált gyöngyökkel kevertük. A kötődési folyamat után a gyöngyöket háromszor mostuk és 1 µM MC-LR-t tartalmazó ROCK reakciópufferben vettük fel, ezt követően a gyanta 20%-át eltávolítottuk és SDS mintapufferben főztük. A c-myc-eNOS foszforilációját 0.2 mM ATP hozzáadásával iniciáltuk 5 mU/mL ROCK jelenlétében. Ezt követően a gyöngyöket 1 órán át inkubáltuk, amelyet hat mosási lépés követett 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) pufferrel a MC-LR, ATP, és Mg²⁺ eltávolítása érdekében. A mosási lépések után a géleket 100 µl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) pufferben vettük fel és 15 percig inkubáltuk 15 nM tisztított FLAG-MYPT1, 5 nM tisztított natív nyúl vázizomból származó PP1c vagy 5 nM PP1c plusz 15 nM FLAG-MYPT1 jelenlétében. A defoszforilációs reakciót forró SDS mintapuffer hozzáadásával állítottuk le, majd a mintát 5 percig főztük és immunoblot analízissel vizsgáltuk.

Protein foszfatáz aktivitás vizsgálat

A kezelés előtt a BPAEC sejteket 16 órán át széruméheztettük, majd 10 nM CLA-val vagy 20 µM EGCG-vel kezeltük 1 órán át. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk (600 g, 5 perc) és PBS-el mostuk, majd 0.1 mM EDTA, 0.5% (v/v) proteáz inhibitor koktélt és 50 mM 2-merkaptoetanolt tartalmazó jéghideg TBS pufferben vettük fel. A sejtizátumot ultrahangos feltárást követően centrifugáltuk (13000 g, 10 perc). A felülúszó foszfatáz aktivitásának mérését a 20 mM Tris-HCl

(pH 7.4) pufferben végeztük 2 μM His-inhibitor-2 (I2) jelenlétében vagy hiányában. A reakciót 1 μM ^{32}P -MLC2 szubsztrát hozzáadásával indítottuk és 10 perc inkubációs időt követően 200 μl 10% TCA és 200 μl 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kicsapott fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk és felszabadult $^{32}\text{P}_i$ mennyiségét szcintillációs számlálóban mértük.

Immunfluorezcencia és konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A BPAEC és HPAEC sejteket zselatinnal fedett fedőlemezekre szélesztettük és 24 órán át tenyésztettük. Inkubációt követően követően 4% (v/v) PFA oldattal 10 percig fixáltuk, majd a sejteket 0.1% Triton X-100-at tartalmazó pufferrel permeabilizáltuk 1 órán át, amelyet 4% (m/v) BSA-t tartalmazó PBS-el háromszori és egyszeri antitest hígító oldattal történő mosási lépés követett. Ezután a sejteket anti-eNOS vagy anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitestekkel éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, majd PBS-el háromszormostuk, ezt követően Alexa-488, illetve Alexa-546-konjugált antitestekkel inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Végül a fedőlemezeket Prolong Gold Antifade médiumban fedtük le. Az eNOS és MYPT1 lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Proximitás ligációs vizsgálat (PLA)

BPAE sejteket 24 lyukú sejtenyésztő edényekben, üveglapokon tenyésztettünk, majd kezelést követően 4% PFA oldattal 10 percig fixáltunk, 0.1% Triton X-100-at tartalmazó oldattal permeabilizáltuk és 5% BSA-t tartalmazó PBS-el blokkoltuk. Ezt követően a proximitás ligációs vizsgálatot a gyártó utasításainak megfelelően hajtottuk végre. Röviden, az eNOS és MYPT1 láthatóvá tételére a mintákat egér anti-eNOS és nyúl anti-MYPT1 antitestekkel éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on, amelyet a PLA próbákkal való inkubálás követett 1 órán át 37 °C-on. Majd a próbák hibridizálását követően a ligázzal való inkubáció következett. Az amplifikációs lépés (rolling-circle amplification, RCA) után pedig a fluoreszcensen jelölt próbákkal RCA termékhez való hibridizálása következett. Három PBS mosást követően a sejteket 4.3 % (m/v) Mowiol-ban fedtük le és a mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Felületi plazmon rezonancia vizsgálat

A GST-MYPT1 és c-myc-eNOS közötti kölcsönhatási vizsgálatot Biacore 3000 készülékkel, felületi plazmon rezonancián alapuló kötődési vizsgálatok során (SPR) tanulmányoztuk. CM5 szenzor chip felszínére anti-GST antitestet kötöttünk ki amin csoporton keresztül, a gyártó

utasításai szerint. A szenzor csip egy felületén rekombináns GST-t míg két másikon GST-MYPT1-et futtató pufferben immobilizáltunk. Ezt követően 0.5 μM és 1 μM rekombináns c-myc-eNOS-t áramoltattunk át a felszínen és a rezonancia jel mértéke alapján meghatároztuk a kötött analit mennyiségét. A rekombináns GST-t és GST-MYPT1-et kötő felszínt azonos módon kezeltük, így a nem specifikus kötődés mértéke is meghatározható volt, amelyet kivontunk a GST-MYPT1-et kötő felszínen kapott értékekből.

Transzendoteliális permeabilitás vizsgálatok

A BPAEC és HLMVEC sejtek transzendoteliális elektromos ellenállását (TER) ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) készülékkel mértük (Model 1600R). BPAEC és HLMVEC sejteket közel azonos számban speciális, arany elektróddal ellátott (8W10E) sejtenyésző edényekbe helyeztük és a kísérleteket akkor végeztük el amikor a rezisztencia minden egyes lyukban elérte az egyensúlyi értéket ($\geq 1000 \Omega$). A kezelések előtt egy órával a BPAEC sejtekre szérumentes tápfolyadékot tettünk, majd a PMA, CLA TM vagy EGCG kezelések során mértük a rezisztencia értékek változását. A HLMVEC sejtek vizsgálata során a kísérletek előtt 6 órával friss EMB-2 tápfolyadékot helyeztünk a sejtekre és az egyensúlyi érték beállta után az Ado vagy ATP γ S kezelések következtében történő rezisztencia változást rögzítettük, majd az adatokat a kezdeti értékekre normalizáltuk és majd ezeket az értékeket ábráztuk.

Quantitatív real-time PCR (qPCR)

Trizol reagens felhasználásával a sejtekben lévő RNS-t izoláltuk a gyártó utasításai szerint. Majd a cDNS-t az iScript cDNA Szintézis Kit felhasználásával írtuk át 1 μg RNS templát felhasználásával. A qPCR reakciókhoz 7.5x-ös hígítású cDNS-t használtunk. A qPCR kísérletet Qiagen Rotor-Gene Q készülék és iQTM SYBR Green szupermix használatával végeztük. Az adatok elemzését a készülék beépített szoftverével végeztük.

cAMP szint mérése

A HLMVEC sejteket 6 lyukú edényekben tenyésztettük és a 90% konfluencia elérésekor 100 μM Ado vagy ATP γ S-el 30 percig kezeltük. Ezt követően a sejteket 1 ml PBS pufferrel mostuk és 250 μl 0.1 M HCl oldatban 20 percig inkubáltuk, majd a sejteket felkapartuk és pipettázással homogenizáltuk. A sejtlizátumot centrifugáltuk (1000 g, 10 perc) és a cAMP szintet a cyclic AMP EIA kit segítségével a gyártó utasításai alapján mértük.

PKA aktivitás mérés

HLMVEC sejteket 30 percig kezeltünk 50 μ M Ado vagy ATP γ S-el, majd a sejteket háromszor mostuk 1 ml jéghideg PBS pufferrel. Ezt követően a sejteket 20 mM MOPS, 50 mM β -glicerofoszfát, 50 mM nátrium fluorid, 1 mM nátrium-ortovanadát, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM AEBSF and 1% (v/v) proteáz inhibitor koktél tartalmú pufferrel lizáltuk. A PKA aktivitást kereskedelmi forgalomban lévő kit (Enzo Life Sciences) használatával mértük a gyártó utasításai szerint. Röviden, a sejtlyizátumot a PKA szubsztráttal fedett 96 lyukú platbe tettük (1 μ g/lyuk) és a PKA aktivitást ATP és Mg²⁺ jelenlétében foszfo-specifikus PKA szubsztrát antitest felhasználásával mértük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A miozin foszfatáz regulátor alegység (MYPT1) és eNOS közötti kölcsönhatás kimutatása

Annak bizonyítására, hogy az eNOS a MP holoenzim szubsztrátja először megvizsgáltuk, hogy az eNOS és a MYPT1 kölcsönhatnak-e az EC-ben. Pull-down kísérleteket végeztünk HUVEC sejtlizátumból GST-MYPT1 kihorgonyzásával a glutation-szefazóz mátrixhoz és megvizsgáltuk a kölcsönható endoteliális fehérjéket. Immunoblott módszerrel azonosítottuk az eNOS-t a kölcsönható partnerek között, ami az eNOS és MYPT1 kölcsönhatására utal, mivel a kontroll GST-pull-down mintákban nem detektáltuk az eNOS-t. Szintén elemeztük a tsA201 sejtekben overexpresszált FLAG-MYPT1 és c-myc-eNOS fehérjék immunprecipitátumát reciprok módon, mely adatok alátámasztották a két fehérje kölcsönhatását. A MYPT1 és eNOS kölcsönhatásának igazolására analitként tisztított c-myc-eNOS-t használtunk SPR alapú protein interakciós vizsgálatokban és vizsgáltuk a szenzor csip felületére immobilizált GST-MYPT1 és GST-vel való kölcsönhatását. A szenzorgrammok stabil interakciót mutattak a MYPT1 és eNOS között, amely kölcsönhatás reverzibilisnek mutatkozott. Az eNOS és MYPT1 kölcsönhatását *in situ* vizualizáltuk a BPAE és HPAE sejtek perinukleáris régióiban konfokális mikorszófia segítségével. A kölcsönhatást PLA vizsgálatokkal is alátámasztottuk. A fenti adatok azt mutatják, hogy az eNOS és MYPT1 kölcsönhatnak az EC-ben, ami arra utal, hogy a MP egy lehetséges PP1 holoenzim jelölt, amely szerepet játszik az eNOS defoszforilálásában.

Az eNOS foszforiláció hatása a NO szintjére

A tsA201 sejtek nem expresszálnak eNOS-t, ugyanakkor feltételezett róluk, hogy tartalmazzák azokat a kináz/foszfatáz enzimeket, amelyek képesek foszforilálni/defoszforilálni az eNOS-t és MYPT1-et. Így, a c-myc-eNOS konstruttal transzfektált tsA201 sejtek megfelelő modell rendszernek tűntek arra, hogy összegezzük a PKC aktiváció és CLA-val (egy membránpermeábilis PP1 és PP2A inhibitor toxinnal) történő foszfatáz inhibíció hatását az eNOS foszforilációra/defoszforilációra. A c-myc-eNOS-t expresszálo sejtekben egy alap szintű eNOS foszforilációt észleltünk a Ser1177 (eNOS^{pSer1177}) oldalláncon, míg a Thr495 (eNOS^{pThr495}) oldallánc foszforilációs szintje alacsony volt. Összhangban az eNOS aktivitását gátló foszforiláció (eNOS^{pThr495}) alacsony és az eNOS aktivitását fokozó foszforiláció eNOS^{pSer1177} magas szintjével a tsA201 sejtek jelentős mennyiségű NO-t termeltek. A PKC aktiváció PMA kezeléssel, vagy CLA-val való kombinált kezelés hatására tsA201 sejtekben az eNOS^{pThr495} szintje ~4- illetve ~7-

szeresére növekedett. Ugyanakkor az eNOS^{pSer1177} szintje kis mértékben emelkedett. A PMA vagy a PMA és CLA kombinált kezelés drasztikusan csökkentette a NO szintjét az eNOS-t overexpresszáló tsA201 sejtekben.

A MYPT1 és eNOS koexpresszió hatása a NO képződésre

Mmegvizsgáltuk, hogy a MYPT1 overexpresszió hatással lehet e az eNOS aktivitására, ezért a tsA201 sejteket FLAG-MYPT1 és/vagy c-myc-eNOS konstrukciókkal transzfektáltuk. A FLAG-MYPT1 önmagában történő transzfekciója során nem detektáltunk NO szint növekedést. Amikor a c-myc-eNOS-t overexpresszáltuk jelentős mértékű NO szint növekedést tapasztaltunk, amely szignifikáns mértékben még tovább növekedett a FLAG-MYPT1 és c-myc-eNOS koexpressziója esetén. Adataink a MYPT1-nek az eNOS aktiválásában és a NO szint növelésében betöltött szerepére utalnak. Mindezek megerősítésére FLAG-MYPT1 konstrukcióval transzfektált HEK293-eNOS knock-in sejtekben is mértük az NO szintet. A HEK293-eNOS sejtek felülűszójában jelentős mennyiségű NO-t detektáltunk a HEK293 sejtekhez képest, míg az eNOS inhibitor L-NAME kezelés a kontroll szintre csökkentette a NO szintjét a csak eNOS-t és az eNOS-t és FLAG-MYPT1-et expresszáló sejtekben is. Meglepő módon azonban a mi kísérleti körülményeink között sem az eNOS expresszióban sem pedig az eNOS^{pThr495} foszforilációs szintjében nem tapasztaltunk változást. Úgy véljük, hogy a MYPT1 és eNOS közötti kölcsönhatás hatással lehet az eNOS szubcelluláris lokalizációjára, amely szintén hatással lehet a NO szintjére.

A PP1c defoszforilálja az eNOS-t *in vitro*

Korábban kimutatták, hogy a PP1c katalitikus alegység defoszforilálhatja az eNOS-t a foszfo-Thr495 oldalláncon, habár az nem tisztázott, hogy a MYPT1 gyorítja e ezt a folyamatot. Így, anti-c-myc-szefarózhhoz kötött c-myc-eNOS-t első lépésben ROCK-al foszforiláltunk és defoszforilációnak vetettük alá a PP1c, FLAG-MYPT1, valamint PP1c plusz FLAG-MYPT1 által. Kimutattuk, hogy a FLAG-MYPT1 önmagában nincs hatással az eNOS foszforilációjára, míg a PP1c bár kis mértékben, de képes volt defoszforilálni a eNOS^{pThr495} oldalláncot, amelynek mértéke jelentősen megnövekedett a PP1c és FLAG-MYPT1 együttes jelenlétében. Eredményeink azt mutatják, hogy a PP1c holoenzim (azaz a PP1c-MYPT1 komplex) egy eNOS foszfatáznak tekinthető. A PP1c és MYPT1 eNOS^{pThr495} defoszforilációjában betöltött szerepének további bizonyítására BPAE sejtekben géncsendesítési kísérleteket végeztünk és vizsgáltuk a eNOS^{pThr495} szintjét. A PP1c csendesítésére egy olya siRNA-t használtunk, amely a PP1c mindhárom (PP1c α ,

PP1c β/δ , PP1c γ 1) izoformájára specifikus, ugyanakkor immunoblott technikával a PP1c δ szintjének csökkenését vizsgáltuk, mivel sejtekben ez az izoforma volt a MYPT1-el kölcsönhatásban. A PP1c δ , MYPT1 vagy mindkettő együttes csendesítése esetén megnövekedett az eNOS^{pThr495} szintje, ami arra utal, hogy a MP holoenzim mindkét alegységének szerepe van a Thr495 oldallánc foszforilációs szintjének szabályozásában.

A foszfatáz inhibitorok hatása a MYPT1 és eNOS gátló foszforiláció szintjére

A PP2A vagy PP1 gátlása érdekében a BPAE sejteket 10 nM kalikulin-A (CLA) illetve 1 μ M tautomycin (TM) tartalmú tápfolyadékkal kezeltük. BPAE sejtek CLA-val történő kezelése drasztikus mértékben növelte, míg a TM és PMA kezelésnek nem volt jelentős hatása a MYPT1 Thr696 (MYPT1^{pThr696}) oldalláncának foszforilációs szintjére. A MYPT1^{pThr696} megnövekedett szintje párhuzamosan változott az eNOS^{pThr495} foszforiláció szintjével. Ellenben a TM az eNOS^{pThr495} kis mértékű, de jelentős növekedését okozta. A tsA201 sejtek esetében tapasztalt foszforilációs változásokkal összhangban a PKC PMA-val történő aktiválása szintén megnövelte az eNOS^{pThr495} szintjét. Mivel PP2A-ról feltételeztük, hogy defoszforilálja a MYPT1^{pThr696} oldalláncot, a fenti adatok alátámasztanak egy olyan modellt, amelyben a PP2A gátlása a MYPT1^{pThr696} oldallánc foszforilációjának növekedéséhez és a MP gátláshoz, ennek következtében az eNOS aktivitás csökkenéséhez vezet a eNOS^{pThr495} növekedése miatt.

A CLA foszfatáz specificitásának megállapítására megmértük a PP1 és PP2A aktivitását a kezeletlen vagy CLA kezelt BPAEC sejtek lizátumaiban PP1-specifikus inhibitor-2 (I2) jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy az összes foszfatáz aktivitás ~65%-a a PP1-nek volt tulajdonítható, míg a PP2A (I2 jelenlétében mért) aktivitás a fennmaradó ~35%. A CLA kezelés az össz foszfatáz aktivitásnak ~25%-os csökkenését okozta, amelynek nagy része (~20%) az I2 kezelt minták esetében volt tapasztalható, amely azt jelzi, hogy a CLA elsősorban a PP2A gátlásáért felelős a BPAE sejtekben.

Az EGCG által kiváltott PP2A által közvetített MP aktiválás hatása az eNOS^{pThr495} defoszforilációjára

Eredményeink arra utalnak, hogy a PP2A a MYPT1^{pThr696} defoszforilációt idézte elő, amely következőképpen eNOS^{pThr495} defoszforilációhoz vezetett, de ez a feltételezett mechanizmus további vizsgálatokat igényelt. Ezért BPAE sejtekben megvizsgáltuk a PP2A aktiválás hatását a MYPT1^{pThr696} és eNOS^{pThr495} defoszforilációjára. Már korábban melanóma sejtekben kimutatták,

hogy az EGCG kötődik a sejtfelszíni 67 kDa laminin receptorokhoz (67LR) és PKA függő módon növeli a PP2A aktivitását. A PP2A ezen aktiválásáról korábban kimutatták, hogy a B δ alegységet tartalmazó PP2A trimer holoenzimre specifikus, amelyet a PKA foszforilál. Igazoltuk, hogy a PP2A-B δ és 67LR is jelen van a BPAE sejtekben. Ezért a PP2A-t EGCG-vel aktiváltuk. EGCG kezelés hatására lényeges csökkenést tapasztaltunk a MYPT1^{pThr696} és eNOS^{pThr495} szintjében, ami arra utal, hogy a PP2A-nak szerepe van ezek defoszforilációjában. Az EGCG a foszfatáz aktivitást is szignifikánsan növelte. Továbbá csökkentette az MLC20 foszforilációs szintjét, amelyet a kettős foszfo-specifikus MLC20^{Thr18/Ser19} antitest (ppMLC20) használatával mutattunk ki.

Tanulmányoztuk a PKA szerepét az EGCG által kiváltott defoszforilációs folyamatokban, ezért csendesítettük a PKA katalitikus alegység α izoformáját (PKA α) BPAE sejtekben és megvizsgáltuk a MYPT1^{pThr696}, eNOS^{pThr495} és ppMLC20 szintjét. EGCG kezelés hatására a kontroll siRNS-el transzfektált sejtekben a MYPT1^{pThr696}, eNOS^{pThr495} és ppMLC20 foszforilációjának mintázata hasonló volt a kontroll, kezeletlen mintákhoz EGCG kezelést követően. A PKA α siRNS-el transzfektált sejtekben viszont a MYPT1^{pThr696}, eNOS^{pThr495} és ppMLC20 alap foszforilációs szintjének növekedését tapasztaltuk, azonban nem tapasztaltunk jelentős mértékű csökkenést ezen foszforilációs helyeken az EGCG kezelést követően. Ezek az adatok igazolták, hogy az EGCG által kiváltott foszfatáz aktiválás PKA függő módon valósul meg.

A PKC aktiválás és a foszfatáz gátlás/aktiválás hatása a NO termelésre valamint a BPAE sejtek transzendenteliális elektromos ellenállására (TER)

A NO szint méréséhez meghatároztuk a sejtek DAF-2 DA fluoreszcencia intenzitását. Eredményeink szerint a PMA kezelés kis mértékben ugyan, de szignifikáns mértékben csökkentette a NO szintjét. Ezzel szemben az EGCG látványosan növelte a NO képződését, valamint fokozta a NO képződést a PMA-val kezelt sejtekben is. A NO termelésben észlelt változások összhangban vannak a eNOS^{pThr495} szintben ezen effektorok hatására történő változásokkal.

A PMA és TM mérsékelt TER csökkenést idézett elő amely a PMA kezelés esetében reverzibilis volt, viszont a TM esetében irreverzibilisnek mutatkozott a vizsgálat időtartama alatt. A CLA kezelés a rezisztencia értékek gyors és drasztikus csökkenését váltotta ki, mely szintén irreverzibilis volt. A foszfatáz inhibitorok ezen “akut” hatása a feltehetően a MP gátlásának köszönhető, amely hosszantartó MLC20 foszforilációt okoz, ami pedig nagymértékben hozzájárul

a TER csökkenéséhez. Ezzel szemben az EGCG kezelés növelte a BPAE sejtek TER értékeit, valamint mérsékelte a PMA kezelés hatására bekövetkező rezisztencia csökkenést mind az együttes kezelés, mind pedig a 30 perces PMA előkezelés után. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az EGCG kezelés hatására bekövetkező foszfatáz aktiváció fokozza az endotél sejtek barrier funkcióját és helyreállítását, legalább részben, a barrier funkciót csökkentő szerek hatását.

HLMVE sejtek barrier funkciójának vizsgálata Ado és ATP γ S kezelések hatására

Régóta ismert, hogy az extracelluláris purinok sejtek közötti jelátvivő molekulákként funkcionálnak, amelyek hatással lehetnek a makrovaszkuláris endotél sejtek barrier funkciójára, azonban hatásuk a mikrovaszkuláris eredetű endotél sejtekre kevésbé ismert. Ezért megvizsgáltuk az Ado valamint az ATP γ S (amely egy nagyon lassan hidrolizáló ATP analóg) hatását a HLMVEC barrier funkciójára. Először a HLMVE sejteket növekvő koncentrációban (25-200 μ M) Ado valamint ATP γ S-el kezeltük és mértük a TER változását. Mindkét vegyület koncentráció függő módon növelte a HLMVEC TER értékeit, amely a sejtek barrier funkciójának erősödésére utal. Kísérleteinkben maximális hatást 100 μ M-al értünk el mindkét esetben, ezért a további kísérletekben 50 (fél maximális) vagy 100 μ M Ado-t vagy ATP γ S-t használtunk.

Purinerg receptorok expressziójának térképezése HLMVE sejtekben

Az extracelluláris adenzin (Ado) a sejt felszíni P1-, míg az ATP γ S a P2 típusú purinerg receptorokon keresztül fejti ki hatását. A P1 adenzin receptorokat négy alosztályba soroljuk: A1, A2A, A2B és A3 csoportokba. Az A1 és A3 receptorok az inhibitor G-proteinekhez (G_i) kötődnek, amelyek gátolják az adenilát cikláz működését, míg az A2A és A2B a G_s típusú proteinekhez kapcsoló receptorok, ezért ezek növelik az intracelluláris ciklikus-AMP (cAMP) szintjét. A P2 receptorok két alosztályba sorolhatók: a P2X (P2X1-7) receptorok extracelluláris ATP-kapuzott, kalcium permeabilis, nem szelektív kation csatornák, amelyek valószínűleg nem játszanak szerepet az endotél barrier funkció szabályozásában. A P2Y receptorok (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14) pedig G-protein kötött receptorok. A purinerg receptorok expressziós mintázata az érrendszer különböző régióiból származó endotél sejtekben eltérő és nem egyértelműen dokumentált, ezért a HLMVE sejteken a P1 és P2Y receptor mRNS-ének átfogó qPCR analízisét végeztük. Eredményeink szerint a P1 adenzin receptorok közül a HLMVE sejtek az A2B receptorokat expresszálják, míg a többi P1 receptor expressziója elhanyagolható. Ez az expressziós mintázat némileg eltér a HUVEC-, és szintén különbözik a HPAE sejtek P1 receptor mintázatától, amely a P1 receptorok által közvetített jelátviteli útvonalak eltérő

jellegére utal ezekben a sejtekben. A P2Y receptorok profiljának vizsgálata azt mutatta, hogy a HLMVEC sejtek mind a nyolc receptor mRNS-ét expresszálják, de legnagyobb mennyiségben a P2Y₁, 4, 6, 13 és 14 receptorokét, míg a többi P2Y receptor mRNS mennyisége alacsonyabb volt.

Az Ado és ATP γ S különböző jelátviteli útvonalakon növeli a PKA aktivitását

Korábban kimutatták, hogy az Ado és ATP által kiváltott barrier funkció erősítéséhez a PKA aktiválása szükséges a HPAE sejtekben. A PKA aktiválásának elsődleges módja cAMP molekulák kötődése a PKA regulátor alegységekhez, amely a katalitikus alegységek disszociációját eredményezi. A G_s-proteinek által közvetített cAMP függő PKA aktiválás az Ado által jól dokumentált, a cAMP független útvonalak kevésbé ismertek. Eredményeink azt jelzik, hogy az Ado kezelés szinte azonnali cAMP szint emelkedést idézett elő, amely csúcspontját, 30-45 perc után érte el, összhangban az Ado által kiváltott TER növekedéssel. Ezzel szemben az ATP γ S által kiváltott barrier funkció erősítést kis mértékű, de szignifikáns cAMP szint csökkenés követett már 2 perc elteltével, amely a G_i-proteinek által közvetített jelátviteli útvonalak szerepére utal a HLMVE sejtekben. Párhuzamosan végzett kísérletekben megvizsgáltuk a PKA aktivitását az Ado és ATP γ S kezelésekre HLMVEC lizátumában. Azt tapasztaltuk, hogy 30 perc kezelést követően mindkét vegyület növelte a PKA aktivitását, amelyet a MYPT1 kettős Ser695/Thr696 oldalláncon történő foszforilációjának növekedése kísért, amely jól definiált PKA foszforilációs helyek. Adataink arra utalnak, hogy az ATP γ S a PKA aktivitásának növekedését idézi elő egy nem konvencionális G_i-proteinek által közvetített útvonalon. Mivel a PKA általi MYPT1 foszforilációnak szerepe van a MP holoenzim aktivitásának szabályozásában, legalábbis *in vitro*, eredményeink azt is jelzik, hogy az ATP γ S által kiváltott PKA aktiváció hatása a HLMVEC barrier funkció növekedésére MP aktivitásától is függ.

Az EPAC1 és PKA szerepe az Ado és ATP γ S által kiváltott HLMVEC barrier funkció erősítésében

A PKA szerepét vizsgálva az Ado vagy ATP γ S által kiváltott HLMVEC barrier funkció erősítésében, tanulmányoztuk a PKA katalitikus alegység (PKAc) csendesítés hatását a MLC20 foszforilációs szintjére. Kontroll, nem-specifikus siRNS-el transzfektált sejtekben az Ado és ATP γ S kezelés is csökkentette az MLC20 foszforilációs szintjét a Thr18/Ser19 oldalláncon. Ugyanakkor a PKAc csendesítése megszüntette az ATP γ S, de nem volt hatással az Ado által

kiváltott MLC20 foszforilációs szintjének csökkenésére, ami egy másik jelátviteli útvonal léte utal. Mivel a másik ismert cAMP effektornak az EPAC1-nek (Exchange factor directly activated by cAMP 1) szerepe van a simaizmok relaxációjának és az MLC20 foszforilációs szintjének szabályozásában, megvizsgáltuk az EPAC1 szerepét az Ado által kiváltott MLC20 defoszforilációban a HLMVE sejtekben. Az EPAC1 csendesítésnek nem volt hatása a cAMP-független ATP γ S által kiváltott MLC20 defoszforilációban, de meglepő módon az Ado által kiváltott cAMP függő MLC20 defoszforilációra sem. A PKAc és EPAC1 együttes csendesítésének hatására viszont nem észleltünk MLC20 defoszforilációt az Ado kezelés következtében, amely azt jelzi, hogy az Ado által indukált cAMP függő modellben, az EPAC1 és PKA aktivációja is szükséges.

A PKA és EPAC1 szerepének tisztázására a HLMVE barrier funkció erősítésében PKAc és EPAC1 csendesítést végeztünk és mértük az endoteél sejtek TER változását az Ado és ATP γ S kezelések során. Azt tapasztaltuk, hogy a PKAc csendesítése jelentős mértékben csökkentette az ATP γ S-, de nem volt hatással az Ado által kiváltott rezisztencia változásokra. Ugyanakkor az EPAC1 csendesítése nem volt hatással sem az Ado, sem pedig az ATP γ S által kiváltott rezisztencia változásokra. Az előző kísérleteinkkel összhangban, a PKAc és EPAC1 együttes csendesítése csökkentette az Ado által indukált TER növekedést, ami szintén azt bizonyítja, hogy a PKA hatása az EC barrier tulajdonságaira az EPAC1 aktivitásától függ. A PKA és EPAC1 gyüttes csendesítése hasonló mértékben csökkentette az ATP γ S által kiváltott rezisztencia növekedést mint a PKAc csendesítés önmagában, amely szintén azt jelzi, hogy az EPAC1-nek nincs szerepe az ATP γ S által kiváltott G $_i$ -közvetített EC barrier funkció fokozásában. Ezek az adatok azt jelzik, hogy bár a PKA önmagában is elegendő a barrier funkció erősítéséhez a ATP γ S modellben, de az Ado által kiváltott barrier erősítés a PKA és az EPAC1 együttes aktivitását igényli.

Az AKAP2-MP tengelynek szerepe van az ATP γ S által kiváltott barrier funkció erősítésben a HLMVE sejtekben

A PKA kötő AKAP (A-kinase Anchoring Protein) állványfehérjéknek szerepe van a PKA szubcelluláris célfehérjéihez való irányításban, valamint felületet biztosítanak a biokémiai kölcsönhatások számára is. Kimutatták, hogy az AKAP-ok a cAMP független PKA aktivációban is szerepet játszhatnak. Továbbá bizonyos AKAP fehérjéknek, (pl. az AKAP9 és -12) szerepe lehet az EC barrier szabályozásában, noha cAMP függő módon. Ezért megvizsgáltuk, hogy az AKAP

fehérjéknek szerepe van e az Ado és ATP γ S által kiváltott TER növekedésében és MLC20 foszforilációjának szabályozásában. Eredményeink arra utalnak, hogy sem az AKAP9-nek sem pedig az AKAP12-nek nincsen szerepe az ATP γ S vagy Ado által kiváltott válaszokban a HLMVE sejtekben. Viszont az AKAP2 csendesítése csökkentette az ATP γ S, de nem volt hatással az Ado által kiváltott TER növekedésre, amely az AKAP2 fontos szerepére utal a cAMP független PKA aktiválásban és barrier funkció erősítésben.

Megvizsgáltuk az AKAP2 közvetlen szerepét az ATP γ S és Ado által kiváltott MLC20 defoszforilációban. Géncsendesítési kísérleteink eredményei szerint az AKAP2-nek kitüntetett szerepe van az ATP γ S, de nincs hatással az Ado által kiváltott MLC20 defoszforilációra. Az AKAP-ok és PP1 holoenzimek kölcsönhatását korábban kimutatták, viszont az AKAP kölcsönhatását a MYPT1-el még nem dokumentálták. Ezért megvizsgáltuk, hogy az AKAP2, vagy más AKAP fehérjék kölcsönhatnak-e a MYPT1-el. Immunoprecipitációs kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a MYPT1 kölcsönhat az AKAP2-vel, de nem detektáltunk kölcsönhatást a MYPT1 valamint az AKAP3, -9 és -12 esetében, amely az AKAP2 és MP specifikus, funkcionális kölcsönhatására utal. Reciprok módon végzett immunoprecipitációs kísérletek szintén igazolták a kölcsönhatást. Továbbá eredményeink bizonyítékot nyújtanak a PKAc és G₁₂ kölcsönhatására is az AKAP2-vel HLMVE sejtekben amely az AKAP2 fontos szerepét jelzi a G₁ által közvetített PKA aktivációban.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az eNOS számos kardiovaszkuláris funkció szabályozásában fontos szerepet játszik. Az eNOS aktivitásának szabályozásában a Thr495 aminosavon történő gátló foszforiláció kitüntetett szereppel bír. Munkánk során különböző biokémiai és molekuláris biológiai technikák alkalmazásával kimutattuk, hogy a miozin foszfatáz (MP) holoenzim, amely egy protein foszfatáz-1 (PP1c) katalitikus és egy MP regulátor alegységből (MYPT1) áll, az eNOSpT495 oldalláncot defoszforiláló foszfatáz. A MYPT1Thr696 gátló foszforilációja szabályozza az eNOSpT495 MP általi defoszforilációját. Foszfataz gátlószerek alkalmazása csökkentette a NO képződését és gátló hatással volt az endotél sejtek barrier funkciójára, amely kulcsfontosságú az erek homeosztázisának fenntartásában. Ezzel ellentétben, az (-)-epigallokatekin-3-gallát (EGCG) kezelés protein kináz A (PKA) által mediált protein foszfatáz 2A (PP2A) aktivációt eredményezett, amely hatására növekedett a MP aktivitása. Az aktivált MP defoszforilálta az eNOSpThr495-t, valamint a 20 kDa molekulatömegű miozin II könnyűláncot (MLC20) a pThr18/pSer19 oldalláncokon, amely az endotél sejtek kontraktilis apparátusának relaxációját idézte elő. Eredményeink arra utalnak, hogy a PP2A és a MP koordinált aktivációjának szerepe van az eNOS fiziológiai aktivációjának szabályozásában. E foszfatazok EGCG általi aktivációja a NO szint emelkedését és az endotél barrier funkció fokozódását is elősegíti.

Az endotél sejtek barrier funkciójának elvesztése az erek permeabilitásának növekedéséhez vezet, amely gyakran súlyos következményekkel jár. Munkánk során kimutattuk, hogy az adozin (Ado) és ATP γ S különböző jelátviteli útvonalakon fejtik ki hatásukat a HLMVEC sejteken. Az ATP γ S a P2Y4 és P2Y12 receptorok közvetítésével cAMP független útvonalon PKA aktivációt idéz elő, amely a ppMLC20 foszforilációs szintjének csökkenéséhez vezet a MP által történő defoszforilációval. Eredményeink alapján ebben a jelátviteli útvonalban az AKAP2-nek is szerepe van. Ezzel szemben az Ado indukálta endotél barrier funkció növekedéséhez a PKA és EPAC1 koordinált cAMP függő aktivációja szükséges.

Összefoglalva, eredményeink kulcsfontosságú endotél fehérjék receptor-mediált foszforilációs-defoszforilációs folyamataira, valamint ezek szabályozásában szerepet játszó kinázok, foszfatazok és jelátviteli útvonalak szerepére derítenek fényt. Bemutatjuk e foszforilációs-defoszforilációs folyamatok fontosságát az endotél sejtek fiziológiai funkciójának szabályozásában, ezért eredményeinknek farmakológiai jelentősége is lehet.



Nyilvántartási szám: DEENK/296/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

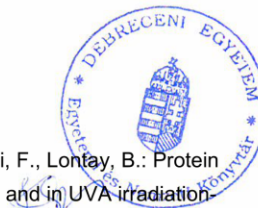
Jelölt: Bátori Róbert Károly
Neptun kód: WDLNJB
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bátori, R. K.**, Kumar, S., Bordán, Z., Cherian-Shaw, M., Kovács-Kása, A., MacDonald, J. A., Fulton, D., Erdődi, F., Verin, A.: Differential mechanisms of adenosine- and ATPγS-induced microvascular endothelial barrier strengthening.
J. Cell. Physiol. [Epub ahead of print], 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26419>
IF: 3.923 (2017)
2. **Bátori, R. K.**, Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedűs, C., Bordán, Z., Verin, A., Lontay, B., Erdődi, F.: Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production.
Sci Rep. 7 (44698), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44698>
IF: 4.122

További közlemények

3. Horváth, D., Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., **Bátori, R. K.**, Dedinszki, D., Szöllősi, A. G., Tamás, I., Iván, J., Kiss, A., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1864 (10), 3268-3280, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.013>
IF: 5.108 (2017)
4. Dedinszki, D., Sipos, A., Kiss, A., **Bátori, R. K.**, Kónya, Z., Virág, L., Erdődi, F., Lontay, B.: Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1852 (1), 22-33, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.005>
IF: 5.158





5. Ruzsnavszky, O., Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., Gáll, T., Balogh, E., Szemán-Nagy, G., **Bátori, R. K.**, Lontay, B., Erdődi, F., Csernoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), 1-10, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF: 3.534
6. Beyer, D., Tándor, I., Kónya, Z., **Bátori, R. K.**, Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., Vasas, G., Mikóné Hamvas, M., Jambrovics, K., Máthé, C.: Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*.
Ann. Bot. 110 (4), 797-808, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs154>
IF: 3.449
7. Altorjay, I., Veréb, Z., Serfőző, Z., Bacskai, I., **Bátori, R. K.**, Erdődi, F., Udvardy, M., Sipka, S., Lányi, Á., Rajnavölgyi, É., Palatka, K.: Anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells.
Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 24 (2), 323-335, 2011.
IF: 2.991
8. Beyer, D., Surányi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdődi, F., Mikóné Hamvas, M., Bácsi, I., **Bátori, R. K.**, Serfőző, Z., Máthéné Szigeti, Z., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, C.: Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro.
Toxicon. 54 (4), 440-449, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/J.toxicon.2009.05.008>
IF: 2.128
9. Palatka, K., Serfőző, Z., Veréb, Z., **Bátori, R. K.**, Lontay, B., Hargitay, Z., Nemes, Z., Udvardy, M., Erdődi, F., Altorjay, I.: Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells.
World J. Gastroenterol. 12 (11), 1730-1738, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v12.i11.1730>.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30,413

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 8,045

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományterületi ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.09.06.

