

Kalmodulin és az ér-reaktivitásban fontos eNOS és MLCK enzimek kölcsönhatásának szabályozása szfingolipid mediátorokkal



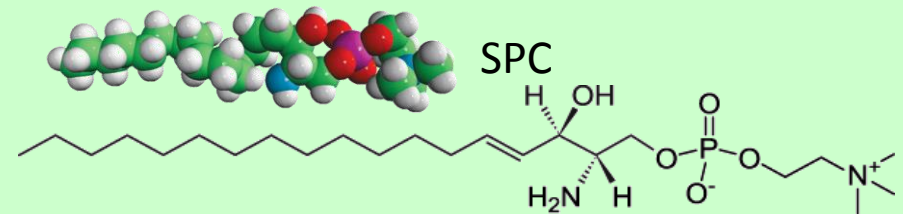
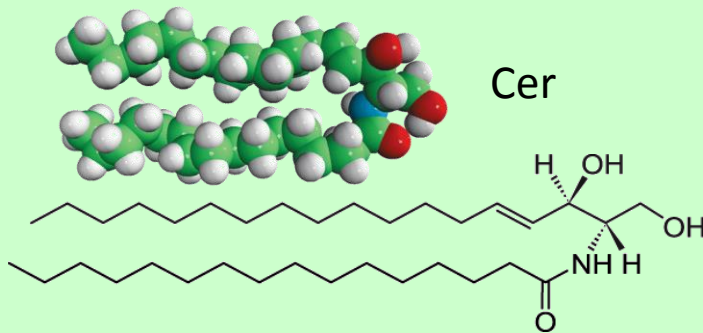
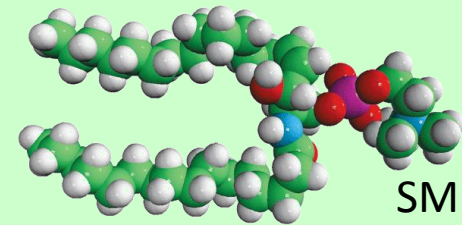
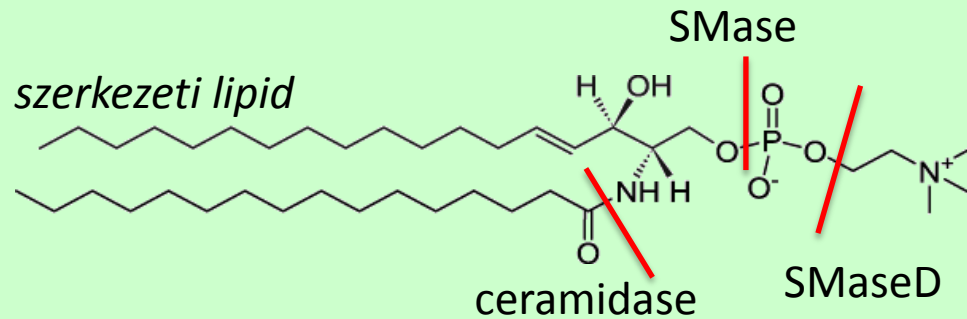
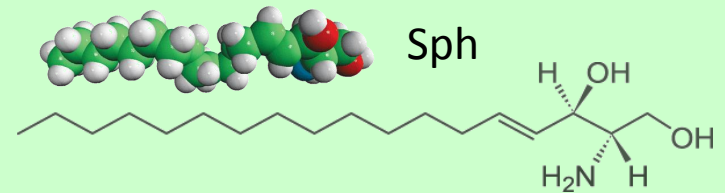
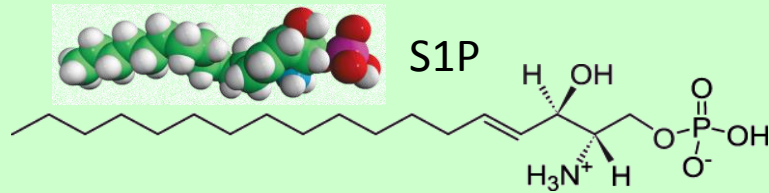
Benyó Zoltán
**SE Klinikai Kísérleti Kutató-
és Humán Élettani Intézet**



Liliom Károly
MTA TTK
Enzimológiai Intézet

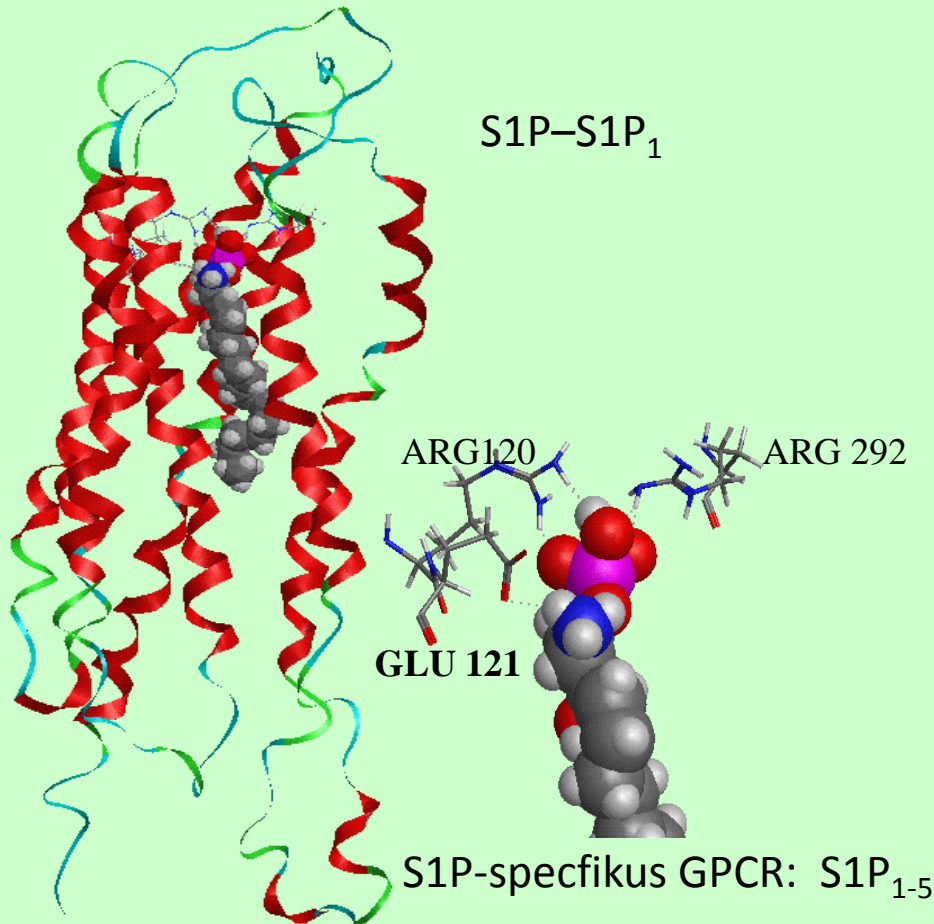
MedInProt Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program
Budapest, 2015. november 14.

Szfangolipid mediátorok

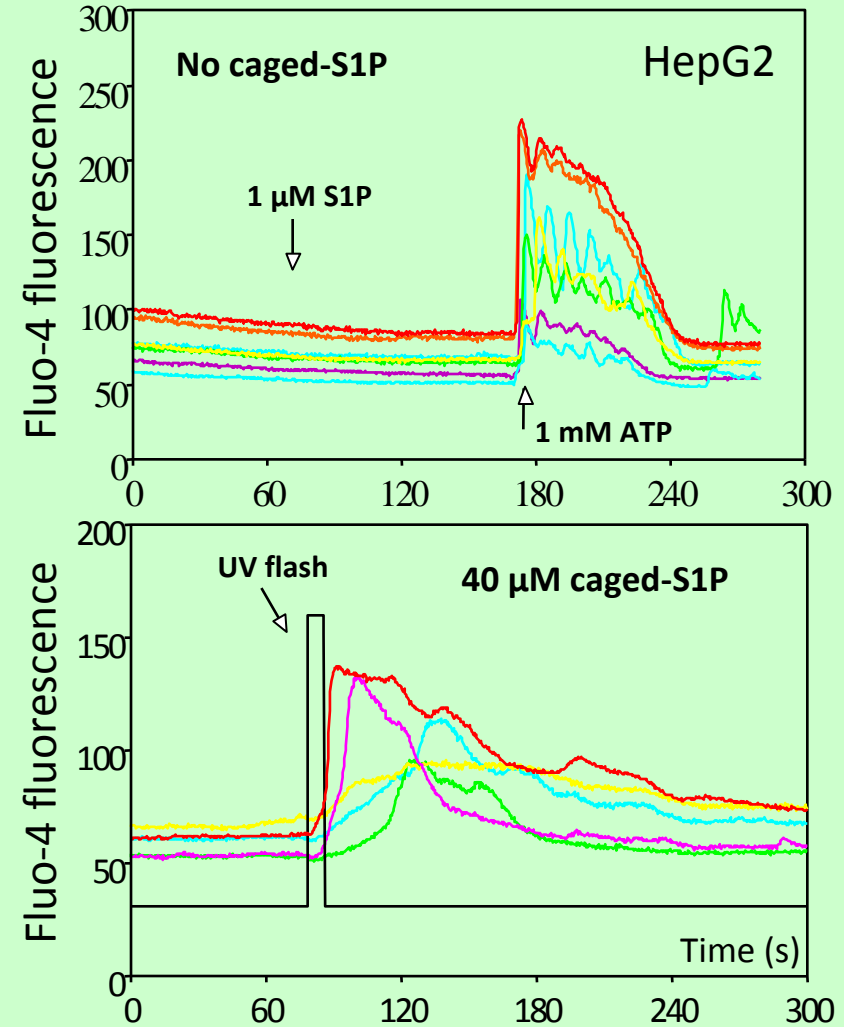


Membránalkotó szfangolipidekből (elsősorban szfangomielinből) keletkeznek a jelátvitelben aktiválódó foszfolipázok hatására. A sejtek növekedési, túlélési/apoptózis, differenciációs és migrációs folyamatainak fontos élettani és patológiás szabályozó molekulái.

Sztingolipid mediátorok: elsődleges és másodlagos hírvivők



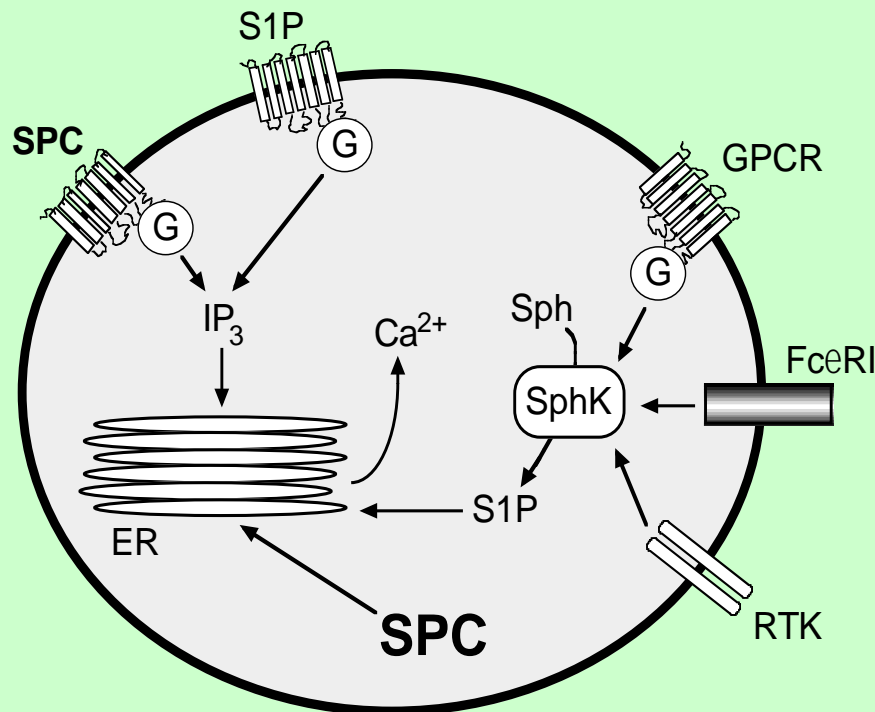
Parrill AL, Wang D, Bautista DL, Van Brocklyn JR, Lorincz Z, Fischer DJ, Baker DL, **Liliom K**, Spiegel S, Tigyi G (2000) J Biol Chem 275(50):39379-84., Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, **Liliom K**, Tigyi G, Parrill AL (2001) J Biol Chem 276(52):49213-20., Fujiwara Y, Osborne DA, Walker MD, Wang DA, Bautista DA, **Liliom K**, Van Brocklyn JR, Parrill AL, Tigyi G (2007) J Biol Chem 282(4):2374-85



A HepG2 sejtek plazmamembránján nincsenek S1P receptorok.

Meyer zu Heringdorf D, **Liliom K**, Schaefer M, Danneberg K, Jaggar JH, Tigyi G, Jakobs KH (2003) FEBS Lett 554(3):443-9

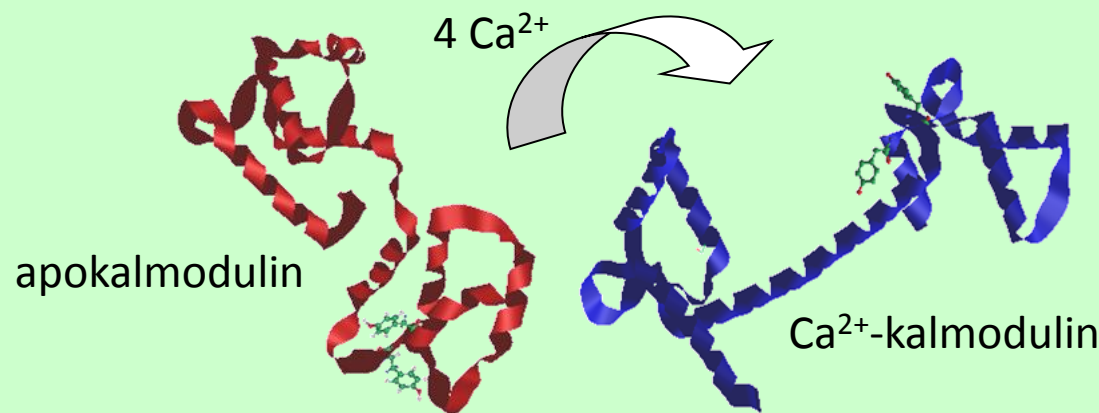
Melyik fehérje közvetíti a receptor-független hatást?



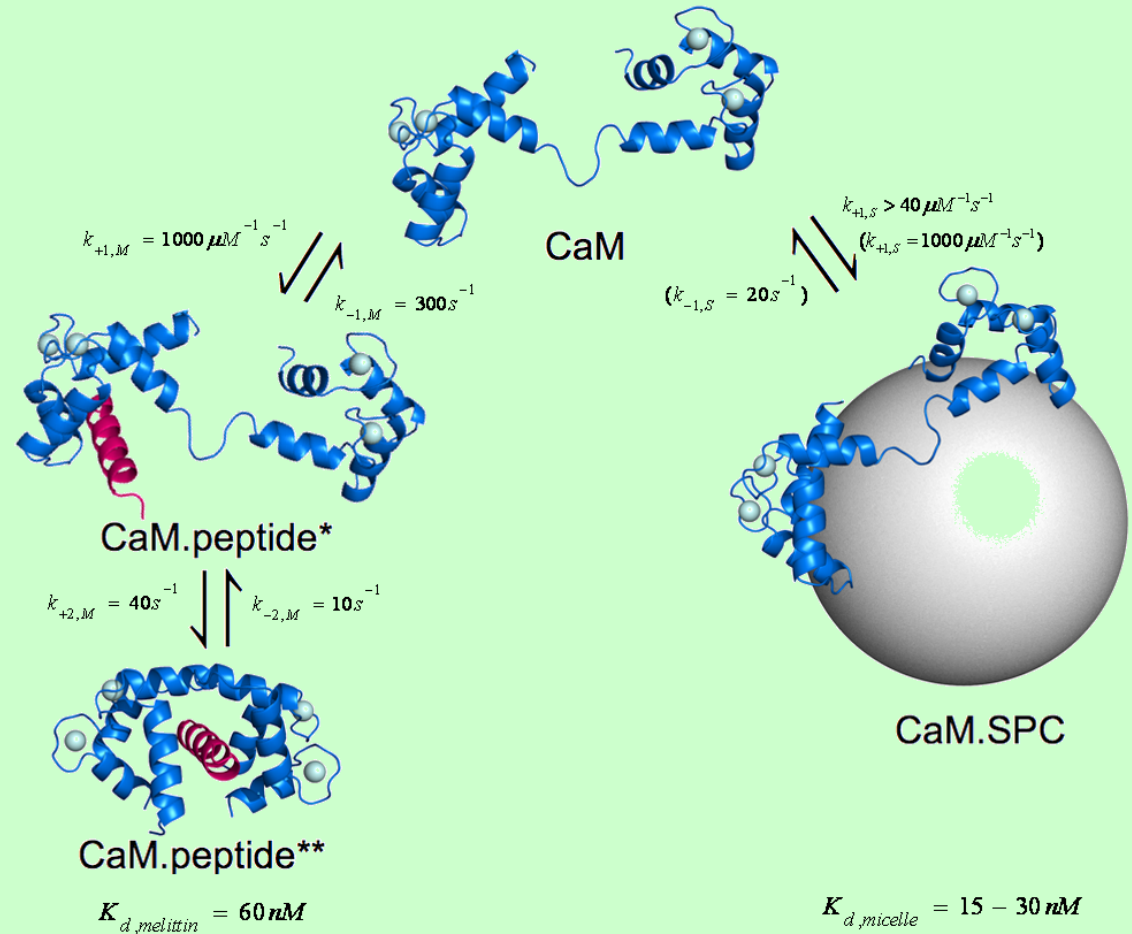
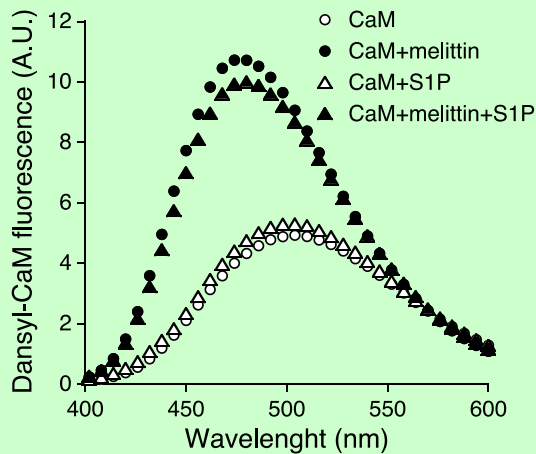
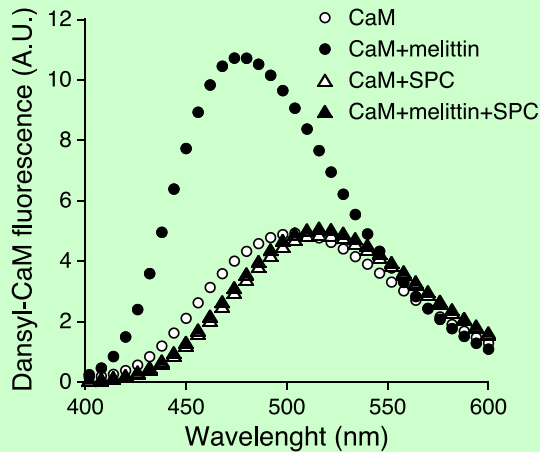
Az S1P és az SPC az IP₃-receptortól függetlenül az ER thapsigargin-szenzitív tartályaiból szabadítja fel a Ca²⁺-ionokat.

A kalmodulinról ismert, hogy szabályozza az IP₃-receptort.

Hipotézisünk: az S1P és/vagy az SPC a kalmodulinra hatva mobilizálhatja intracellulárisan a Ca²⁺-ionokat.



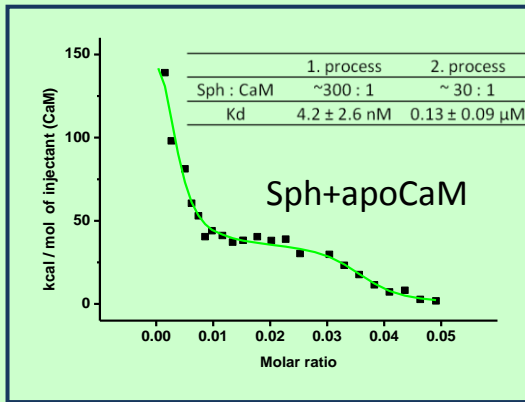
Az SPC a kalmodulin kompetitív gátlószere



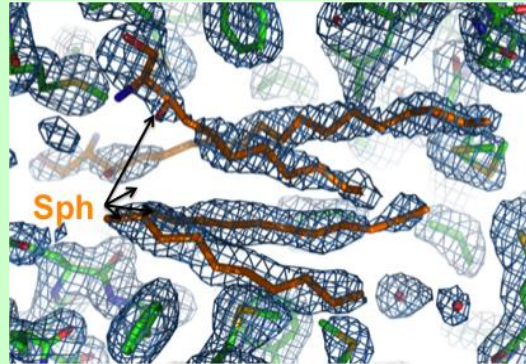
Kovacs E, Tóth J, Vértessy BG, **Liliom K** (2010) Dissociation of calmodulin-target peptide complexes by the lipid mediator sphingosylphosphorylcholine: implications in calcium signaling. *J Biol Chem* 285(3):1799-808
 Kovacs E, **Liliom K** (2008) Sphingosylphosphorylcholine as a novel calmodulin inhibitor. *Biochem J* 410(2):427-37

Kalmodulin kölcsönhatása szfingozinnal

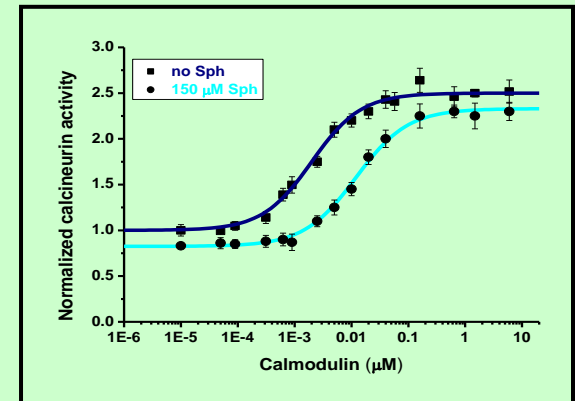
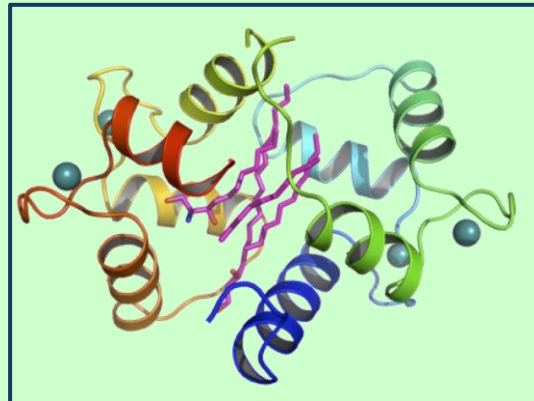
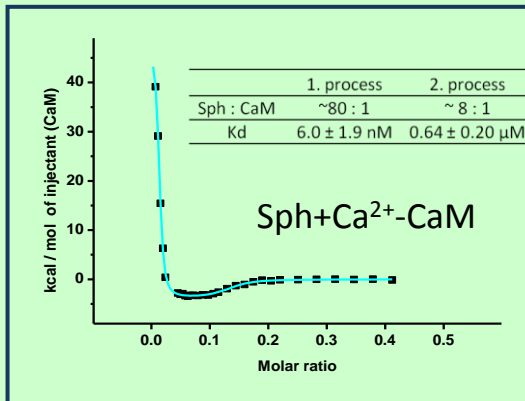
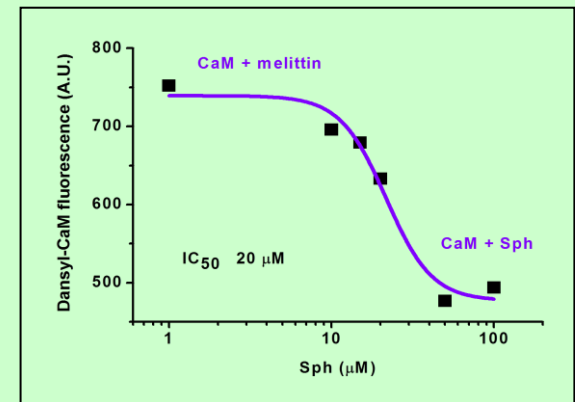
Affinitás + sztöchiometria



Sph – Ca²⁺-CaM kristályszerkezete

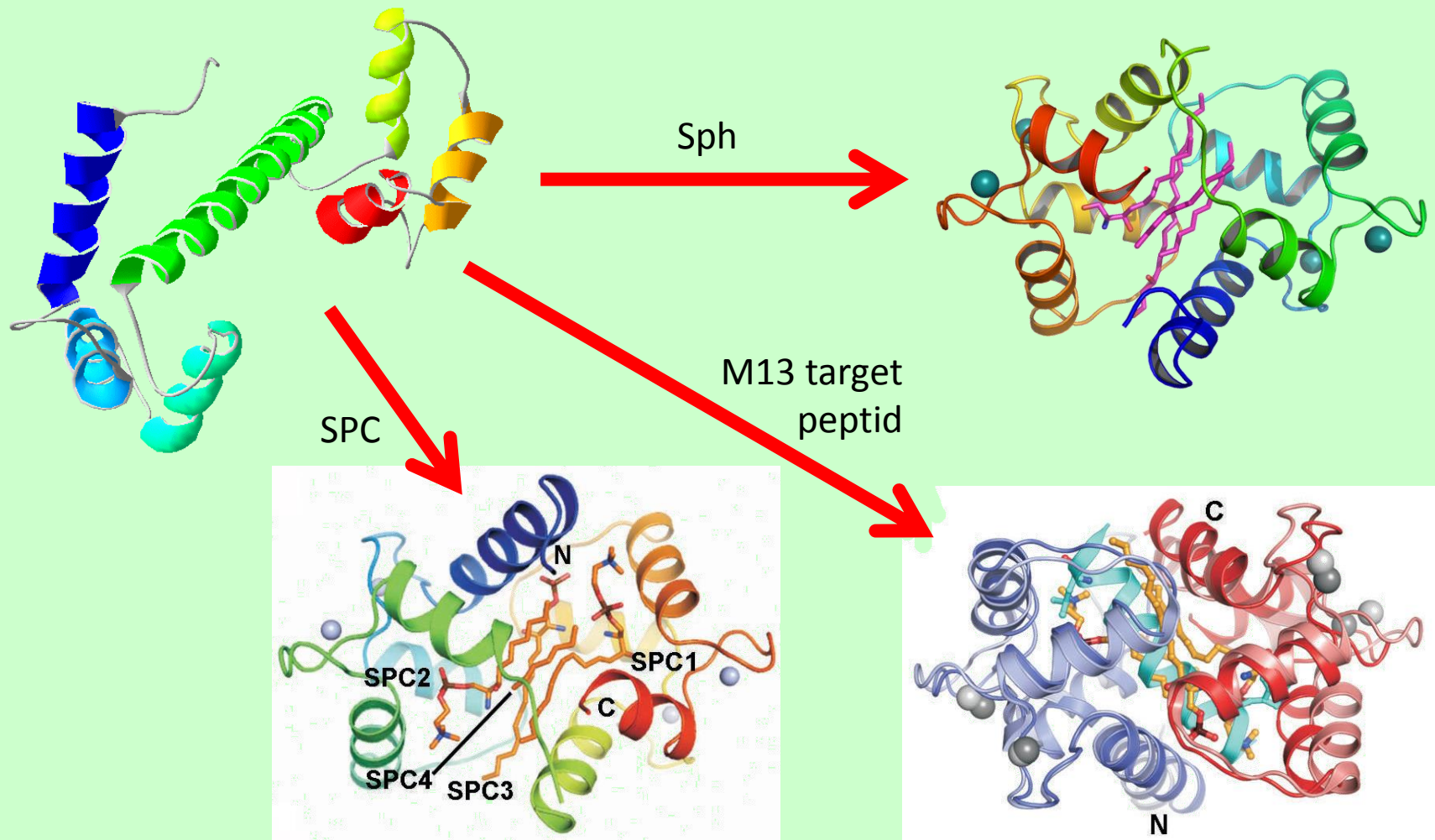


Funkcionális esszék



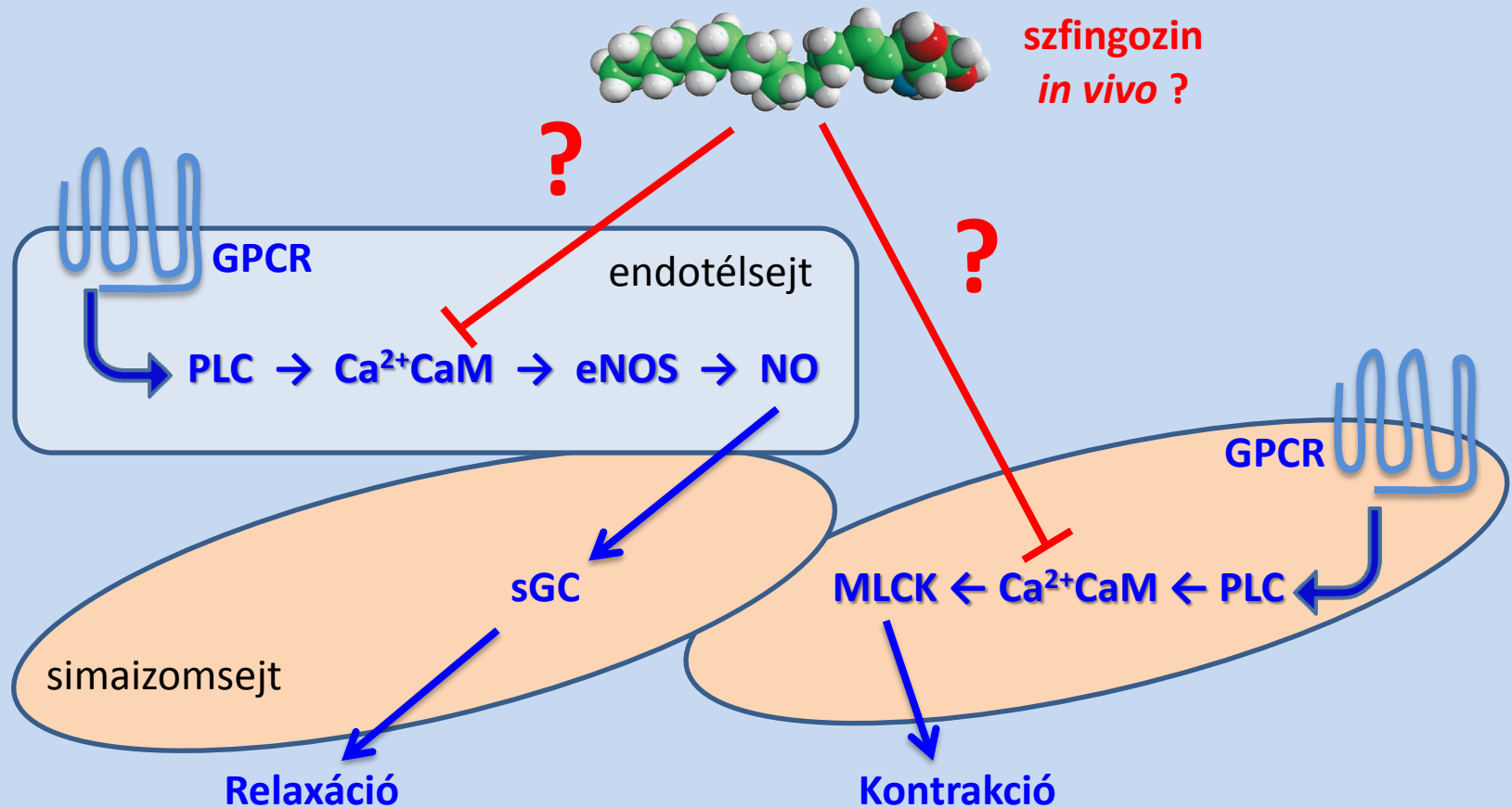
A szfingozin is kötődik mind az apo-, mind a Ca²⁺-kalmodulinhoz és gátolja azok funkcióját.

A kalmodulin SPC és Sph kötődésére zárt inhibitorikus konformációt vesz fel



Kovacs E, Harmat V, Tóth J, Vértessy BG, Módos K, Kardos J, **Liliom K** (2010) Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions. *FASEB J* 24 (10): 3829-3839

eNOS és MLCK az értónus szabályozásában

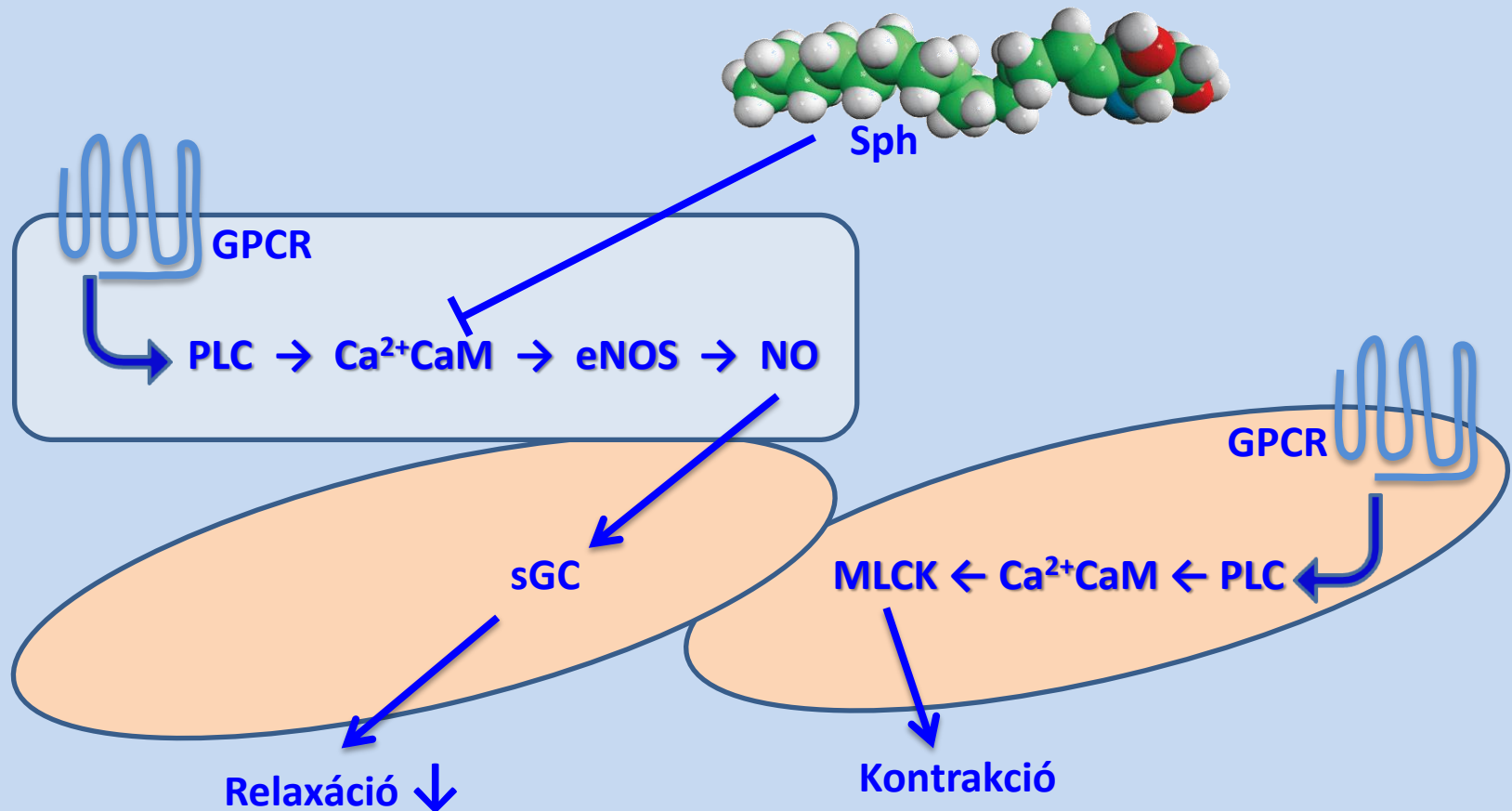


Ruisanchez É, Dancs P, Kerék M, Németh T, Faragó B, Balogh A, Patil R, Jennings BL, Liliom K, Malik KU, Smrcka AV, Tigyi G, **Benyó Z** (2014) Lysophosphatidic acid induces vasodilation mediated by LPA1 receptors, phospholipase C, and endothelial nitric oxide synthase. *FASEB J* 28(2):880-90

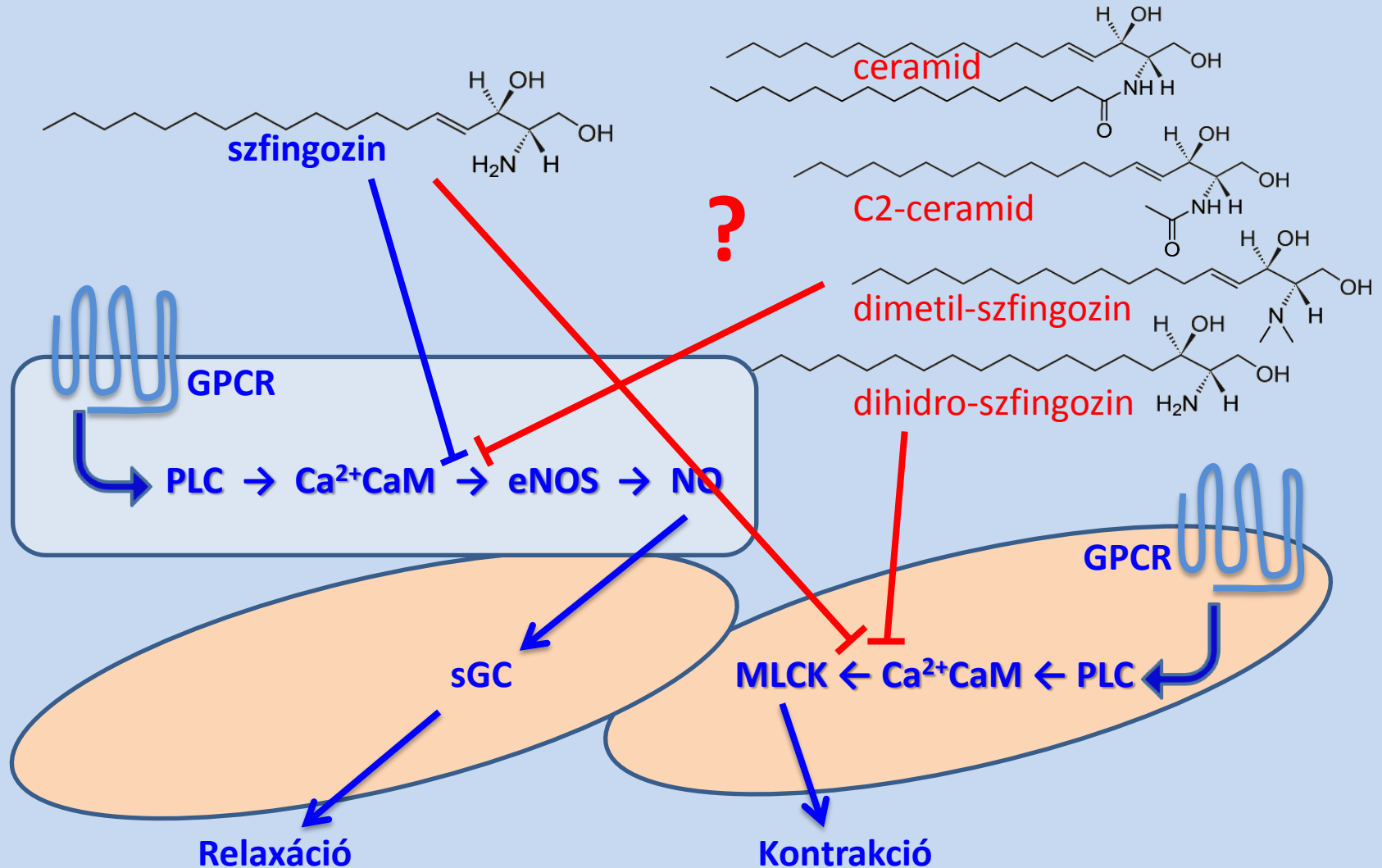
A projekt előző fázisában elért eredmények

A szfingozin kalmodulin-függő módon gátolja

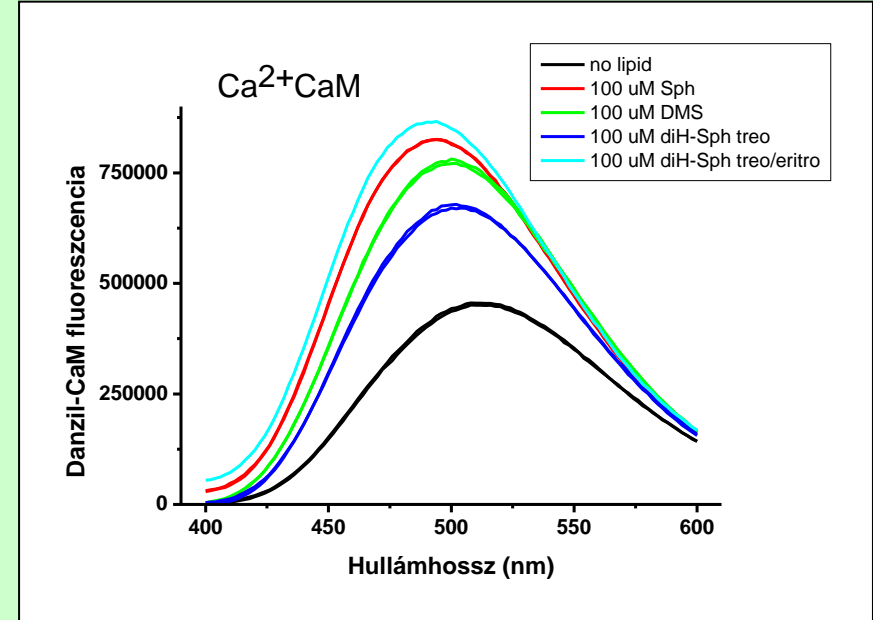
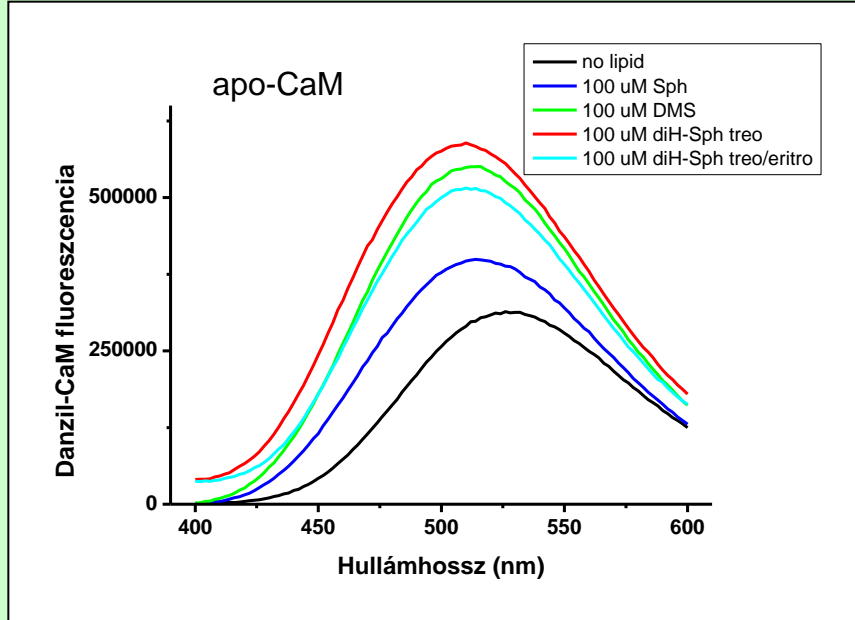
- az eNOS aktivitását in vitro és az
- eNOS által közvetített vazorelaxációt ex vivo egér aorta-gyűrűkön



Gátolják-e a szfingozin és analógjai az eNOS és az MLCK kalmodulin-függő aktivitását in vitro és ex vivo?



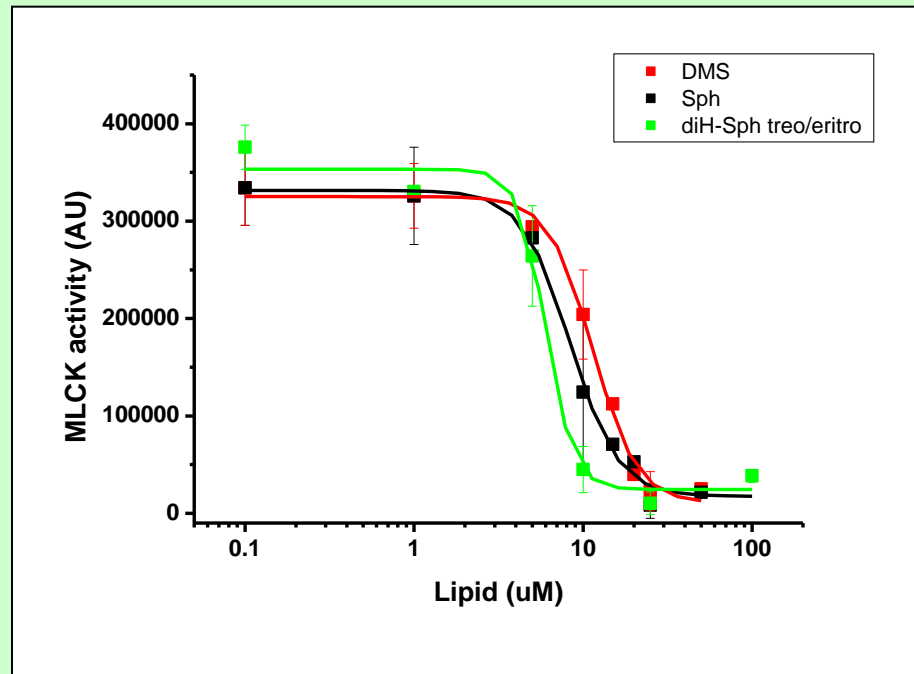
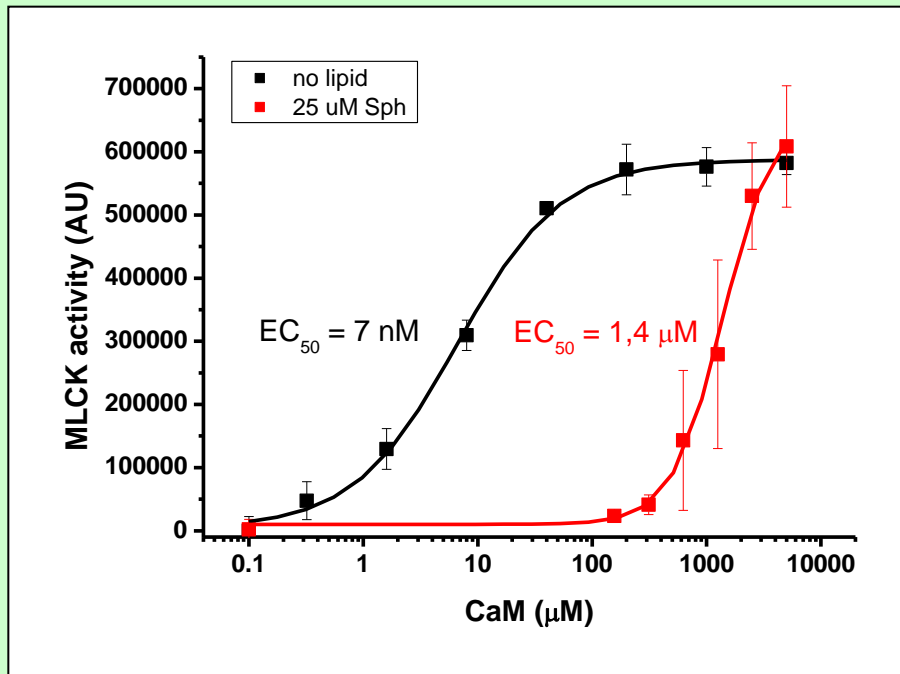
A dimetil-szvingozin és a dihidro-szvingozin is kötődnek a kalmodulinhoz



A szfingozin, dimetil-szvingozin és dihidro-szvingozin kötődésének hatására a danzil-jelölő fluoreszcencia intenzitása megnő és a maximális emisszió hullámhossza kék-eltolódást mutat.

A ceramidok kötődését nem tudtuk kimutatni a danzil-fluoreszcenciás mérésben.

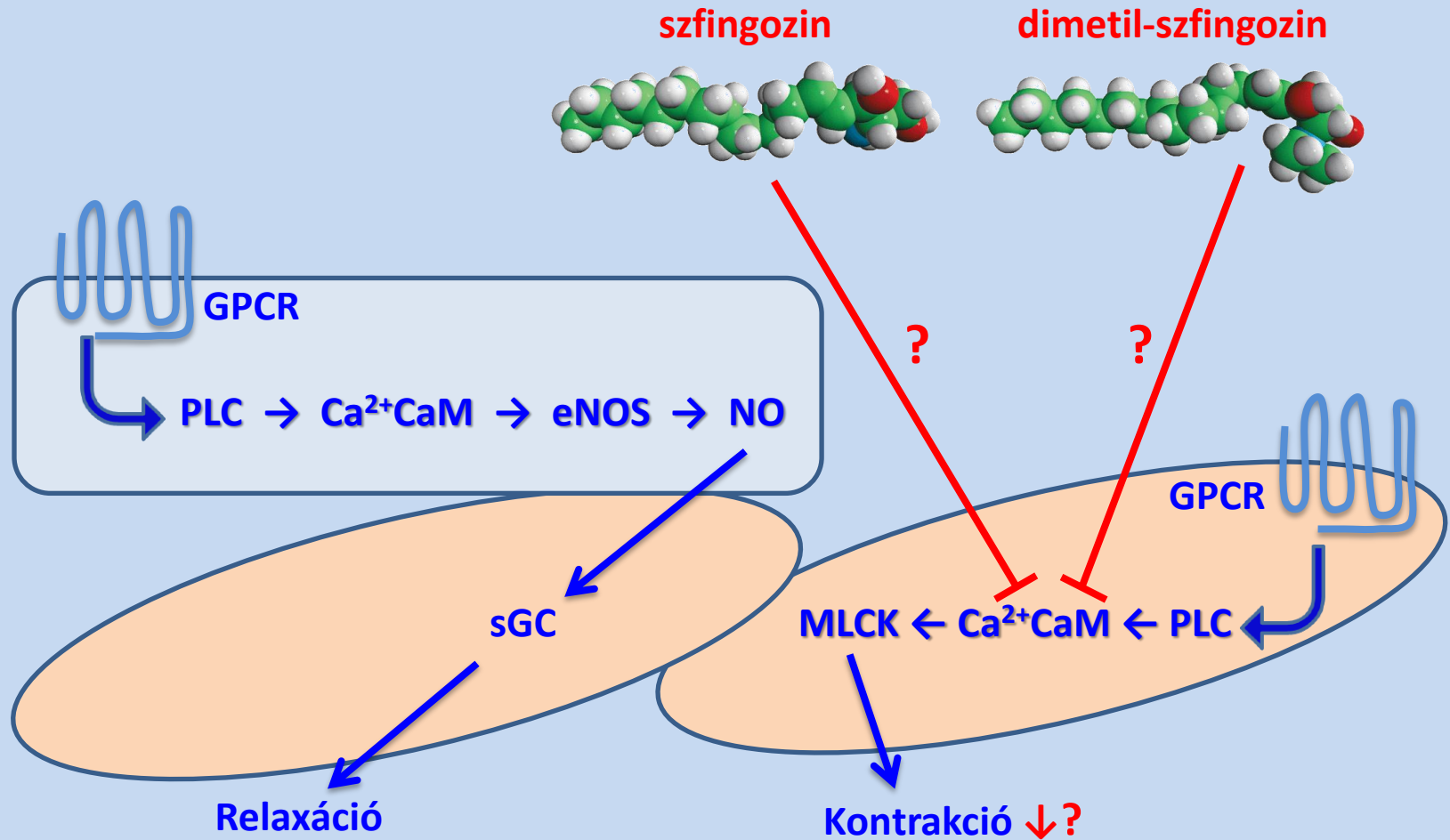
A szfingozin és analógjai gátolják az MLCK kalmodulin-függő aktivitását in vitro



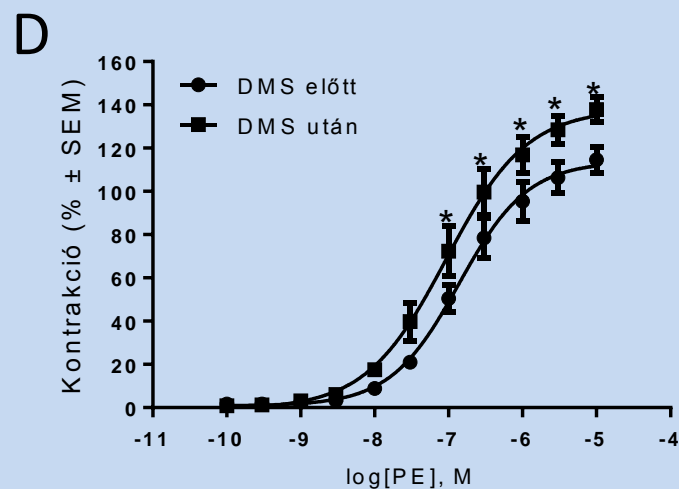
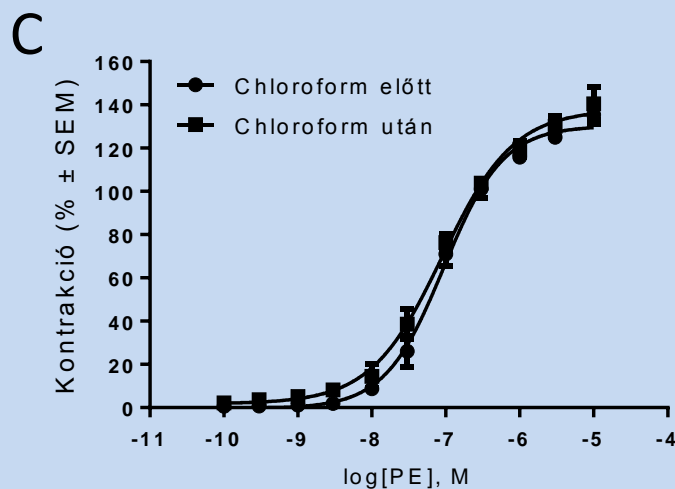
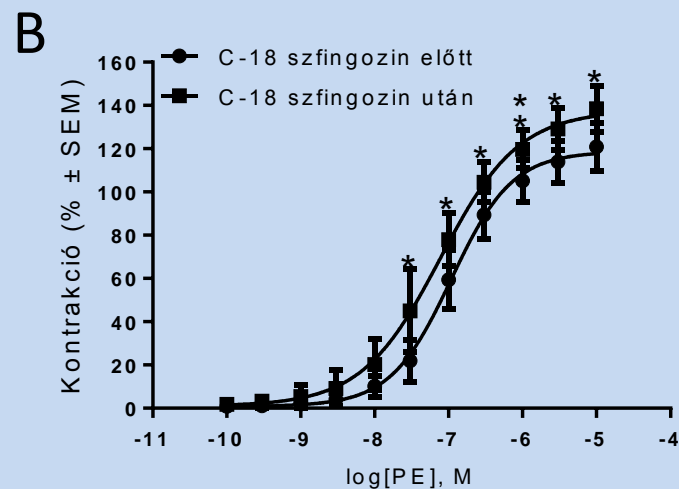
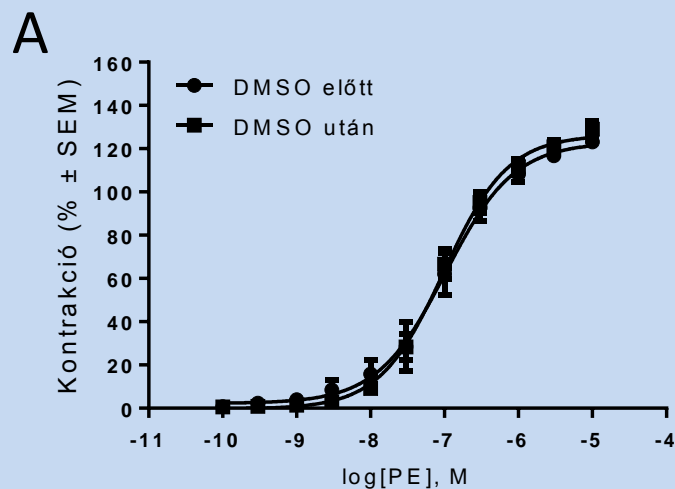
Az MLCK enzimet növekvő koncentrációjú kalmodulinnal aktiváltuk, illetve közepes kalmodulin mellett növekvő koncentrációjú lipidekkel inkubáltuk. Már 25 μM szfingozin jelenlétében az MLCK aktivitás nagymértékben gátlódik, illetve a dimetil-szfingozin és a dihidro-szfingozin gátlási hatékonysága azonos a szfingozinével. (C.M.C \sim 10-15 μM)

A ceramid vegyületek nem gátolták az MLCK kalmodulin-függő aktivitását.

Gátolja-e a szfingozin és a dimetil-szfingozin az MLCK által közvetített vazokonstriktiót?

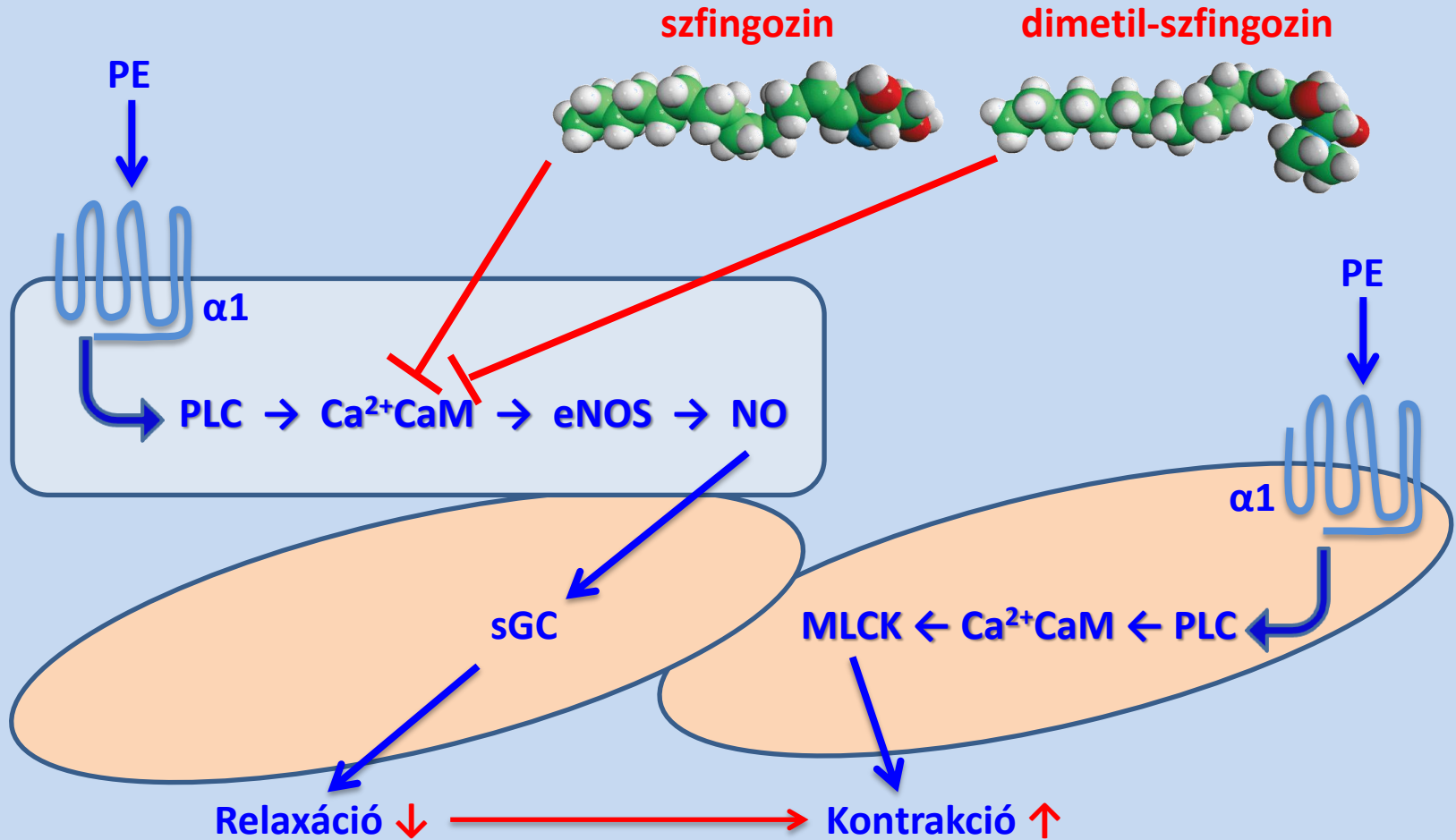


Szvingozin (B panel, 10 μM), dimetil-szvingozin (DMS, D panel, 10 μM) ill. vehikulumaik (A és C panelek) hatásai a fenilefrin (PE) okozta vazokonstrikcióra

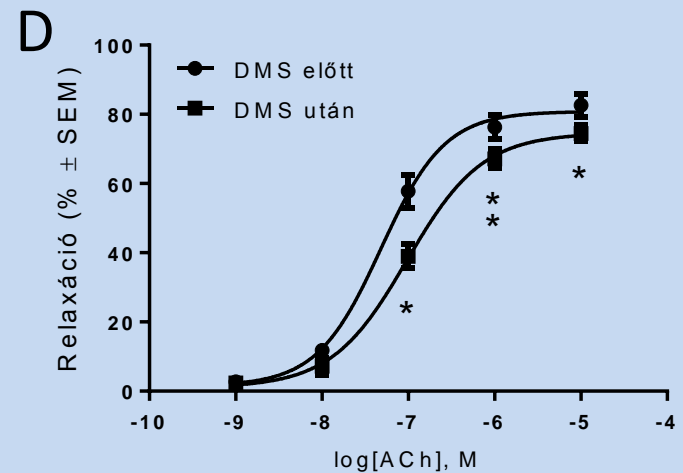
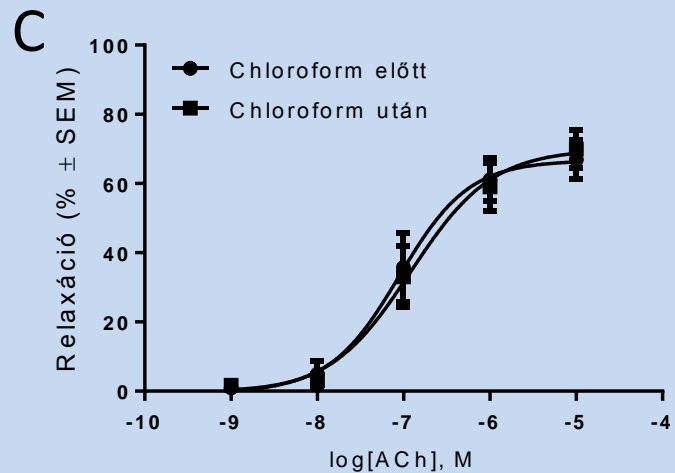
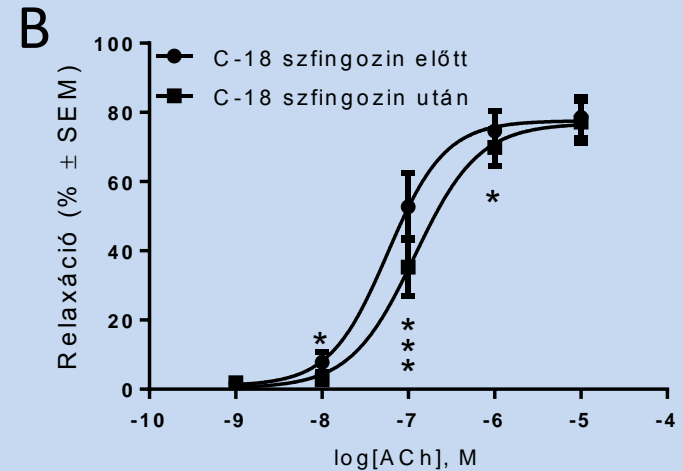
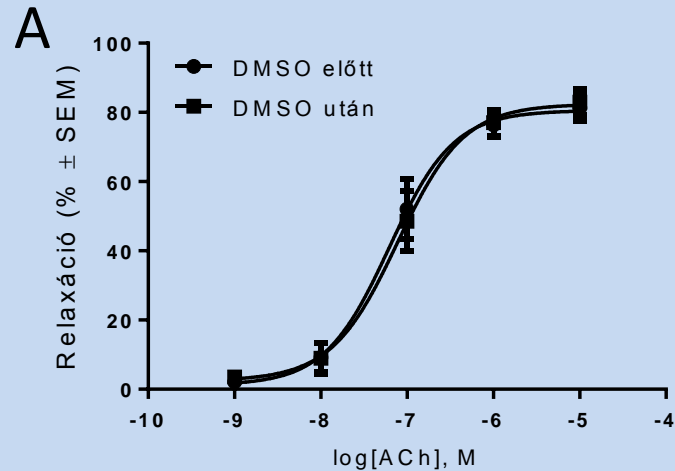


Feltételezett magyarázat:

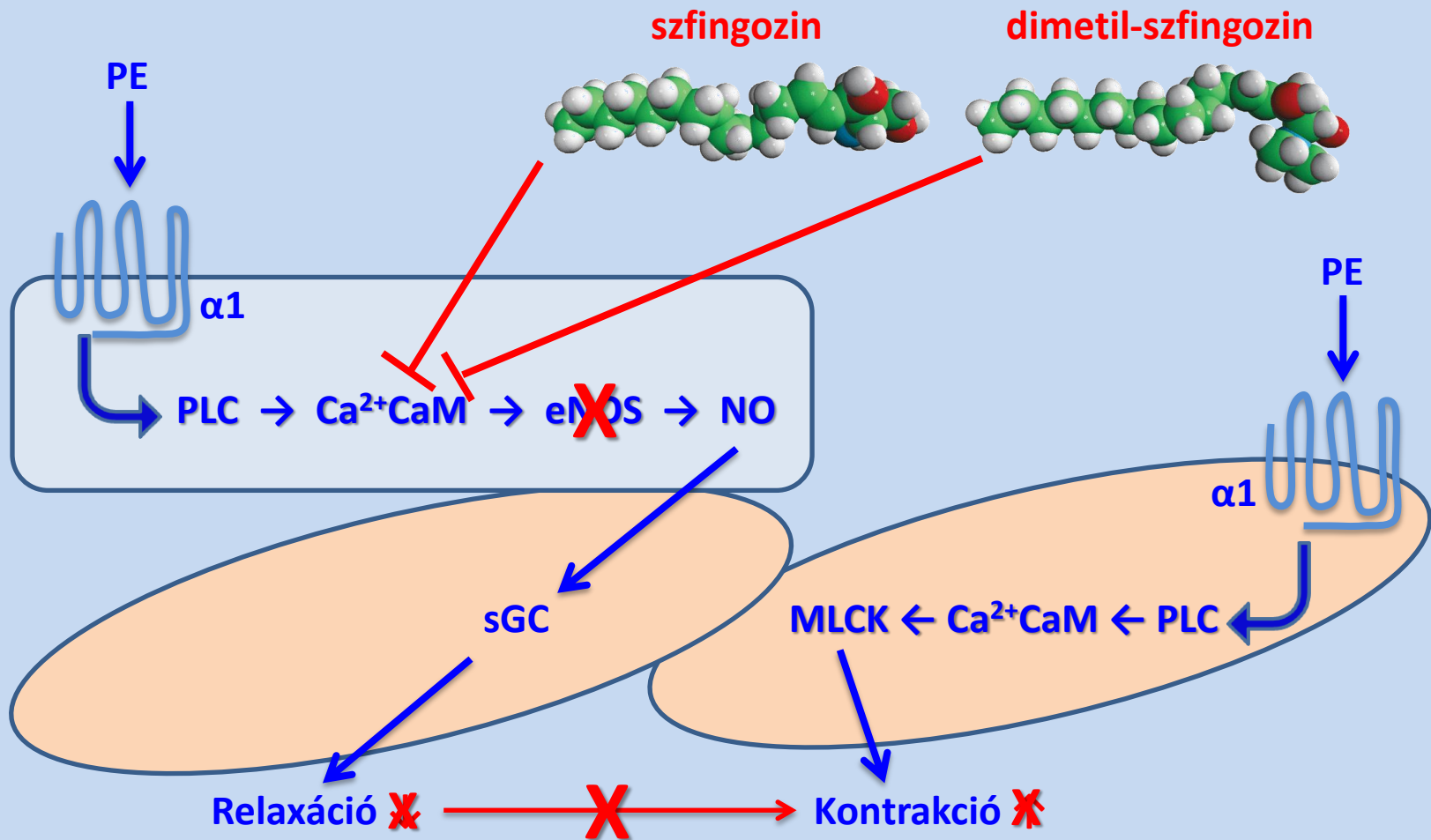
Szvingozin, ill. dimetil-szvingozin gátolja az eNOS-függő vazorelaxációt és ezáltal közvetve fokozza a vazokonstriktiót



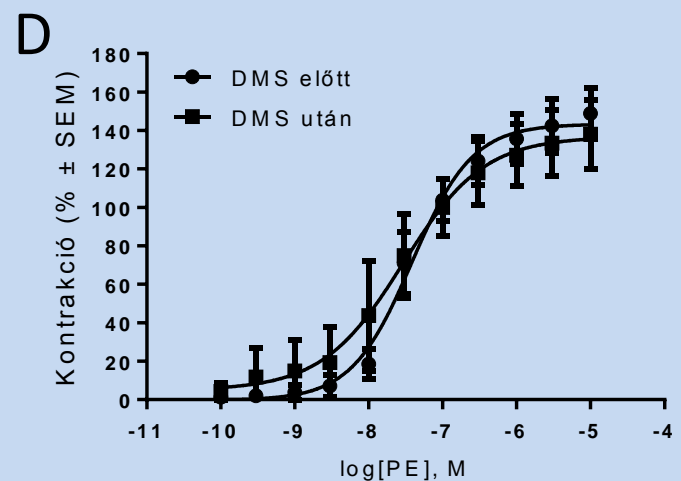
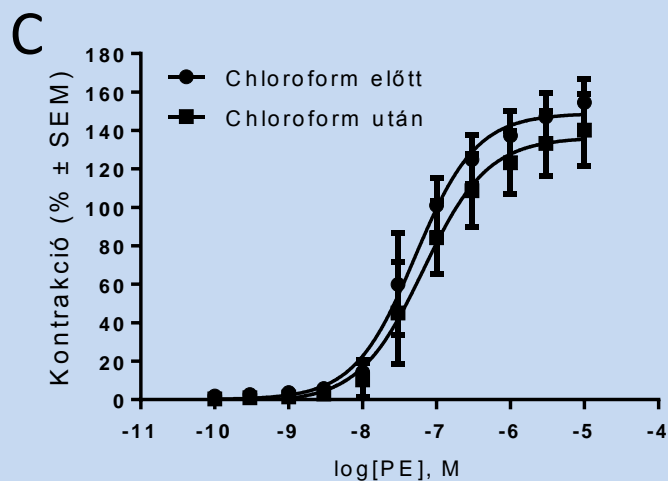
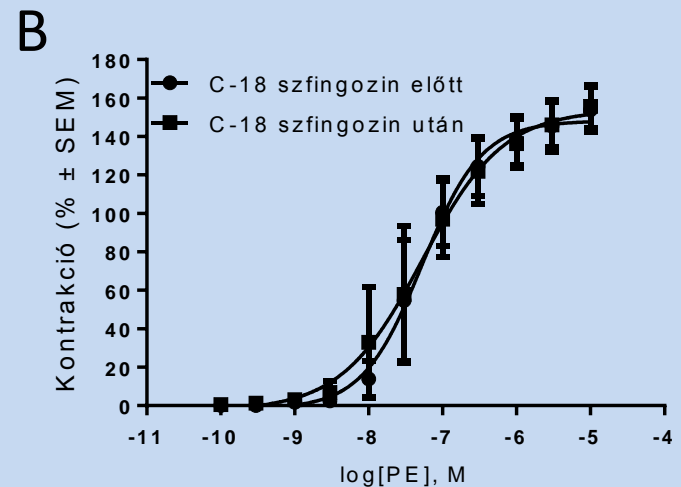
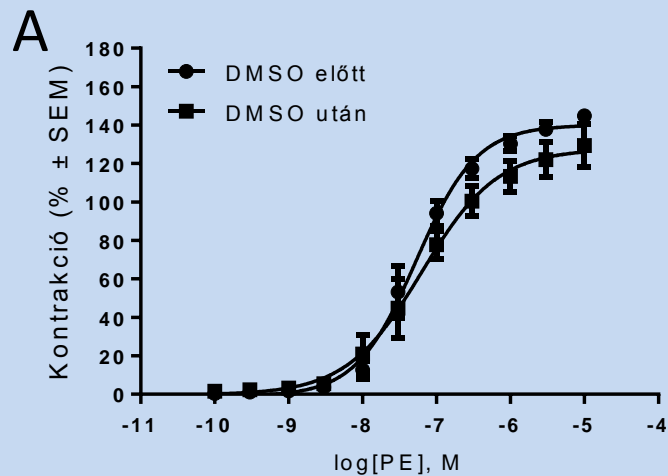
Szfingozin (B panel, 10 μ M), dimetil-szfingozin (DMS, D panel, 10 μ M) ill. vehikulumaik (A és C panelek) hatásai az acetilkolin (ACh) okozta eNOS-függő vazodilatációra



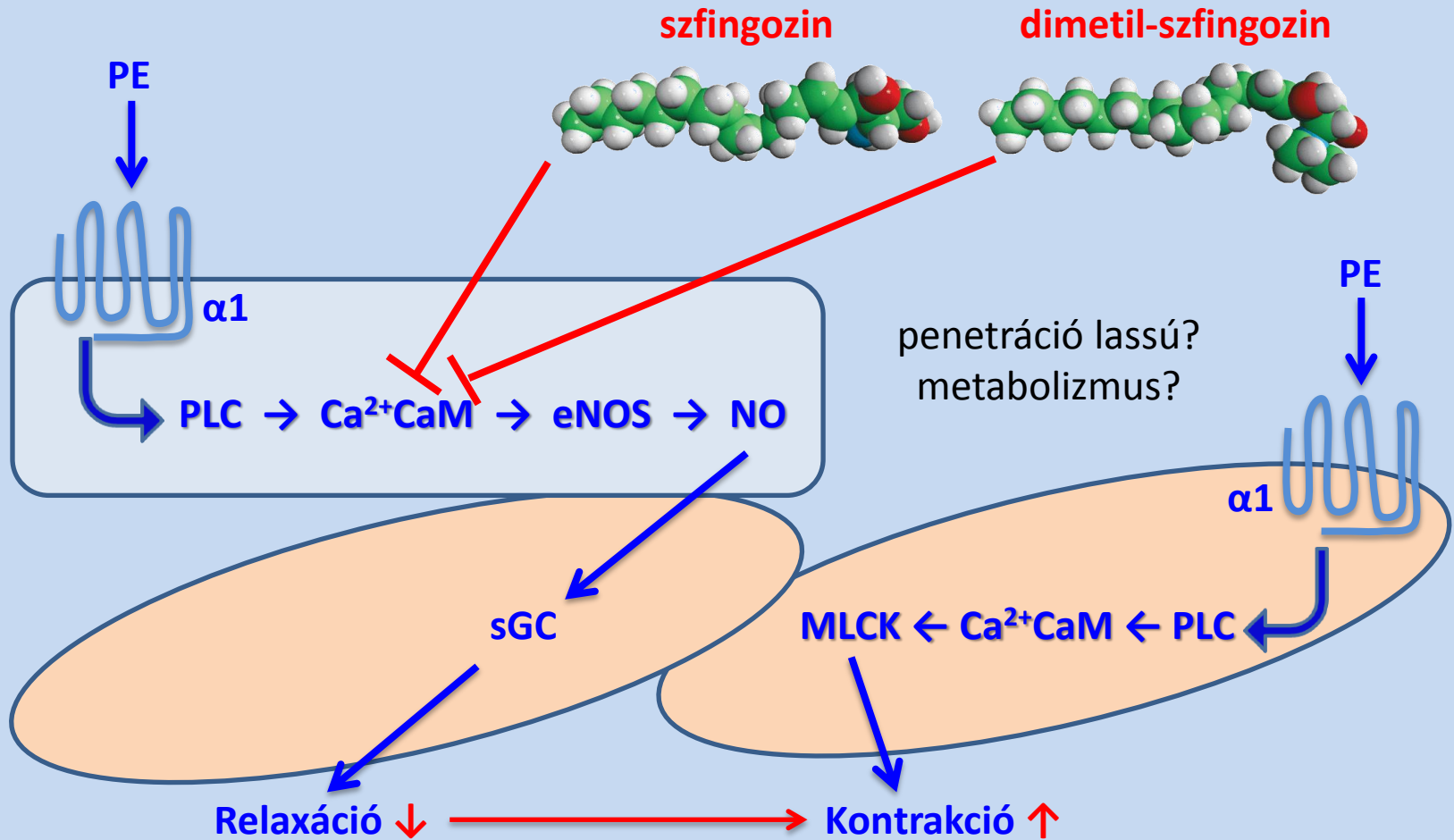
A hipotézis tesztelése eNOS-KO erek vizsgálatával



Szvingozin (B panel, 10 μM), dimetil-szvingozin (DMS, D panel, 10 μM) ill. vehikulumaik (A és C panelek) hatásai a fenilefrin (PE) okozta vazokonstrikcióra eNOS-KO erekben



Konklúzió



Konklúzió

- Megmutattuk, hogy a kalmodulin-antagonista hatású szfingozin gátolja az eNOS kalmodulin-függő aktivitását *in vitro* és egér aorta szegmenseken *ex vivo*
- Megmutattuk, hogy a szfingozin és analógjai gátolják az MLCK kalmodulin-függő aktivitását *in vitro*
- A ceramidok kötődését és hatását a kalmodulinon nem tudtuk kimutatni
- A dimetil-szfingozin a szfingozinnal azonos aktivitású egér aorta szegmenseken *ex vivo*

Köszönetnyilvánítás



Juhász Tünde

Ruisanchez Éva

Dancs Péter, Hricisák László, Kerék Margit

Köszönjük a MedInProt támogatását!