

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİLAMİN PROTEİNLERİNİN HÜCRELERDEKİ İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI

REZA SALIMI

MOLEKÜLER TIP

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970181

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİLAMİN PROTEİNLERİNİN HÜCRELERDEKİ İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MOLEKÜLER TIP

DOKTORA TEZİ

REZA SALIMI

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Nilgün Yener

İkinci Danışmanım: Prof. Dr. Levent Akyürek

Bu Araştırma Göteborg Üniversitesinde, İkinci Danışmanım, Prof. Dr. Levent Akyürek
Tarafından Desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Reza Salimi tarafından gerçekleştirilen “**FİLAMİN PROTEİNLERİNİN HÜCRELERDEKİ İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” konulu Doktora tezini 06.03.2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Başkan

Doç. Dr. Nilgün YENER

DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

Prof. Dr. GÜL HÜRAY İŞLEKEL
DEÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim D.
DEÜ SBE Moleküler Tıp AD.



Üye

Prof. Dr. GÜL GÜNER AKDOĞAN
İzmir Ekonomi Üniv. Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü



Üye

Yard. Doç. Dr. ASLI SADE
MEMİŞOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi
Fen Fakültesi

Üye

Doç. Dr. Mert ÖZGÖNÜL
EGE Üniv. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya A D.

Yedek Üye

Doç. Dr. Nursel ACAR
EGE Üniv. Fen Fak.
Kimya Böl.

Yedek Üye

Doç. Dr. ZAHİDE ÇAVDAR
DEÜ Sağlık Bil. Enstitüsü
Moleküler Tıp AD

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR.....	v,vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİS VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	8
2.1. Filaminler.....	8
2.2. Filamin A (FLNA).....	9
2.3. Filaminler ve Hücre Motilitesi	11
2.4. Filaminler ve Sinyal İletimi	11
2.5. Filaminler ve Transkripsiyon Düzenlemesindeki Rollerini	13
2.6. Kalpain ve Kalpeptin.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Araştırmanın Tipi	21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	21
3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları.....	21
3.4. Çalışma Materyali	21
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	22
3.6. Veri Toplama Araçları.....	23
3.6.1. Hücre Çözülmesi	23
3.6.2. Hücre Kültürü	23
3.6.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi	24
3.6.4. Westen Blot Deneyleri.....	25
3.6.5. Protein Tayini	30
3.6.6. Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri	31
3.6.7. Koloni Oluşturma Deneyleri	34
3.6.8. Hücre Proliferasyon Deneyleri, MTT.....	35

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	36
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	37
3.9. Araştırmanın Sınırlıkları.....	37
3.10. Etik Kurul Onayı.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kalpeptin Optimizasyon Deneyleri.....	38
4.2. Kalpeptin'le Etkileştirilen Hücrelerde FLNA ^{CT} İfadesi	39
4.3. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde İnvazyon.....	41
4.4. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde Migrasyon.....	43
4.5. Kalpainin İnhibisyonu Hücrelerin Koloni Oluşumunu Azaltır.....	44
4.6. Kalpeptin'le Etkileştirilmiş Hücrelerde Gözlemlenen Hücre Proliferasyonu.....	46
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
8. EKLER.....	60

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Ayırıcı (separating) Jel İçeriği.....	26
Tablo 2. Paketleyici (stacking) Jel İçeriği.....	26
Tablo 3. Towbin Transfer Tamponu.....	27
Tablo 4. Araştırma Planı.....	36



ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa No
Şekil 1. HIF-1 α fonksiyonunun FLNA tarafından düzenlenmesi.....	6
Şekil 2. FLNA'nın filamentöz aktin ile etkileşimi için önerilen bir model.....	9
Şekil 3. FLNA'nın monomerik yapısı ve FLNA ile etkileşimde olan proteinler	10
Şekil 4. FLNA, hücre hareketliliği sırasında küçük GTPazlar için bir iskelet sağlar.....	12
Şekil 5. FLNA ve nükleer proteinler arasındaki etkileşimler için önerilen şematik model.....	14
Şekil 6. Ca ²⁺ içermeyen insan m-kalpain molekülünün üç boyutlu yapısı.....	17
Şekil 7. İnsan kalpain aile üyelerinin altbirim yapıları.....	18
Şekil 8. Kalpain'in Ca ²⁺ ile aktivasyon mekanizması.....	19
Şekil 9. Kalpeptin, bir kalpain 1 (μ -kalpain) ve kalpain 2 (m-Kalpain) inhibitörüdür.....	19
Şekil 10. Hemositometrik olarak hücre sayımında kullanılan Neubauer lamı görüntüsü.....	24
Şekil 11. Western blot tekniğinde kullanılan aparatlar	29
Şekil 12. BCA protein tayini.....	31
Şekil 13. Migrasyon ve invazyon deneylerinde kullanılan transwell aparatları	33
Şekil 14. Koloni oluşturma.....	34
Şekil 15. MTT testi.....	35
Şekil 16. Kalpeptin Optimizasyon Deneyleri.....	38
Şekil 17. Kalpeptin'le Etkileştirilen Hücrelerde FLNA _{CT} İfadesi	39,40
Şekil 18. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde İnvazyon	42
Şekil 19. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde Migrasyon	43
Şekil 20. Kalpainin İnhibisyonu Hücrelerin Koloni Oluşumunu Azaltır.....	45
Şekil 21. Kalpeptin'le Etkileştirilmiş Hücrelerde Gözlemlenen Hücre Proliferasyonu	46
Şekil 22. FLNA'nın kalpain tarafından kesilmesi mekanizmasını göstermek için önerilen şema.....	51

KISALTMALAR

FBS: Fötal Sığır Serumı (*Fetal Bovin Serum*)

DMEM: *Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı*

EMEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

CO₂: Karbondioksit

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic Acit*

EDTA: *Etilendiamin Tetraasetik Asit*

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (*Phosphate Buffered Saline*)

DMSO: *Dimetil Sulfoksid*

FLNA: Filamin A (İnsan)

FLNA^{CT}: Karboksi Terminal ucundan kesilmiş FLNA

CT: *Carboxyl-Terminal*

H1: Hinge 1 (menteşe 1)

H2: Hinge 2 (menteşe 2)

FLNB: Filamin B (insan)

FLNC: Filamin C (insan)

Flna: Filamin a (fare)

Flnb: Filamin b (fare)

Flnc: Filamin c (fare)

HIF-1 α : *Hypoxia-İnducible Factors*

A7: *Human Melanoma Cell*

PC3: *Human Prostate Cell*

T241: *Mouse Fibroblast, Fibrocarsoma*

MS1: *Mouse Endothelial Cell*

mRNA: *Messenger RNA*

ABP: *Actin-Binding Proteins*

KDa: Kilodalton (Atomik Kütle Birimi)

Ig: İmmunoglobulin

CH1: Kalponin Homolog Domain 1
CH2: Kalponin Homolog Domain 2
GTP: *Guanozin Trifosfat*
Cdc: *Cell Division Control Protein 42 Homolog*
ROCK: *Rho-Associated Protein Kinase*
PAK1: *Serine/Threonine-Protein Kinase 1*
Trio: *Triple Functional Domain Protein*
PEBP2 beta: *Phosphatidylethanolamine-Binding Protein*
CBF beta: *Core-Binding Factor Beta Subunit*
SMAD: *SMAD Family (Mothers Against Decapentaplegic Homolog)*
BRCA2: *DNA Repair Associated*
FOXC1: *Forkhead Box Protein C1*
PBX1: *Pre-B-cell Leukemia Transcription Factor 1*
ERK: MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase
p-ERK: Phospho-MAPK, Phospho Mitogen-Activated Protein Kinase
AKT: Serine/Threonine Protein Kinase
p-AKT: Phospho Serine/Threonine Protein Kinase
RhoA: *Transforming Protein RhoA*
RalA: *Ras-Related Protein*
Rho: *Ras-like GTP-Binding Protein*
Rac: *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*
AR: Androjen Reseptörü
MTT: *(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide: Thiazolyl blue*
SD: *Standard Deviation (Standart Sapma)*
AR: Androgen Receptor
LNCaP: Androgen-Bağlı Prostate Kanseri Hücreleri
ECL: *Enhanced Chemiluminescent*
IC₅₀: *Half-Maximal (50%) Inhibitory Concentration*

Teşekkür

Doktora öğrenimim süresince her zaman güler yüzlü, sabırlı ve destekleyici olan, bilimsel bilgi, birikim ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve bana her türlü konuda yardımcı olan danışmanım Doç. Dr. Nilgün YENER'e

Bana yurt dışında çalışma olanağı sağlayan ve bu süreçte her zaman yardımcı ve destekleyici olan, bilimsel bilgi, birikim ve deneyimlerini esirgemeyen ve bana her türlü konuda yardımcı olan ikinci danışmanım Prof. Dr. Levent AKYÜREK'e

Doktora eğitimim süresince bana her türlü desteği sağlayan ve beni hep güler yüz ve sabırla karşılayan Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL'e

Ve Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nın bütün Öğretim Üyelerine ve İdari Personeli'ne

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında, gerekse tez yazımı sırasında, bana yardımcı olan ve her zaman yanımda olan Roghaiyeh SAFARİ'ye

Tüm eğitimim boyunca, her türlü maddi ve manevi desteği ile her zaman benim yanımda olan değerli arkadaşım Ziya DENEK'e

Benim bu günlere gelmemde çok yoğun emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini benden sakınmayan değerli aileme şükran ve minnet duygularıyla sonsuz teşekkürler ediyorum.

Reza SALİMİ

FİLAMİN PROTEİNLERİNİN HÜCRELERDEKİ İŞLEVLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Reza Salimi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, rezasalimitr@yahoo.com

ÖZET

Amaç: Filaminler, çok fazla miktarda eksprese edilen, aktin bağlayıcı büyük proteinlerdir ve F-aktin'in üç boyutlu yapısını sağlamca kuvvetlendirerek hücre zarına bağlanmasını sağlarlar. Filaminler içinde, filamin A (FLNA) en çok bulunan izoformdur ve yaygın olarak insan dokularında eksprese olmaktadır. Kalpain, FLNA'yı tercihen menteşe 1 ve 2 (H1, H2) bölgesinden keser ve karboksil terminal uç içeren FLNA^{CT}'yi üretir. Kalpeptin ise, FLNA'nın kesilmesinden sorumlu bir kalpain 1 ve 2 inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı, FLNA'nın kesilmesinin engellenmesiyle, hücrenin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneklerini, azaltabileceğimiz yönündeki hipotezimizi test etmektir. Böylece kalpeptin'in kanser dokularının büyümesini ve yayılmasını engelleyerek tedavi edici bir rolünün olup olmadığının anlaşılması hedeflenmiştir. Ayrıca, FLNA'nın hücredeki işlevinin belirlenmesi ve kalpeptin gibi inhibitör moleküllerin tanımlanması, kanser tedavilerinde kullanılacak daha etkili ilaçların geliştirilmesine de çok büyük katkılar sağlayacaktır.

Yöntem: Bu çalışmada A7 (İnsan Melanoma), PC3 (İnsan prostat kanser), T241 (Fare fibroblast, fibrosarkoma) ve MS1 (Fare endotel) hücre hatları kullanarak; hücre kültürü, western blot, proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma deneyleri yapıldı.

Bulgular: Kalpeptin varlığında, hücrelerin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneklerinde kontrol guruba kıyasla anlamlı olarak azalma gözlemlendi. Veriler ortalama \pm SD değerleri olarak gösterildi ve n = 3 olarak alındı. Gruplar arası istatistik analizinde unpaired two-tailed Student t testi kullanıldı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonucu, kalpeptin'in, FLNA'yı eksprese eden kanser hücrelerinde kalpain'e bağlı olarak oluşan FLNA^{CT} üretimini azalttığını gösterdi. Öte yandan, azalmış FLNA^{CT} üretimine sahip hücreler, anlamlı olarak (p<0.05) daha az migrasyon, invazyon, proliferasyon ve koloni oluşturma yeteneği gösterdiler. Bu veriler ayrıca, FLNA^{CT} fragmanının, hücrelerin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturmalarında önemli düzenleyicilerden biri olduğunu da göstermiştir.

Araştırma deneysel niteliktedir ve deneysel kısım Götting Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarlarında, 2014-2017 yılında yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Filamin, Filamin A, Kalpain, Kalpeptin, Proliferasyon, Migrasyon, İnvazyon, Koloni oluşturma, Kanser.

INVESTIGATION OF FILAMIN PROTEIN FUNCTIONS IN CELLS

Reza Salimi, University of Dokuz Eylül, Enstitü of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, 35340, Inciraltı-Izmir, Türkiye rezasalimitr@yahoo.com

ABSTRACT

Objective: Filamins are large actin-binding proteins that stabilize three-dimensional actin filament networks and link them to cellular membranes where they integrate cell architectural and signaling functions important for cell locomotion. Filamin A (FLNA) is the most abundant and widely expressed isoform in human tissues. Endogenous 90 kDa Carboxyl-terminal (CT) (FLNA^{CT}) is produced by cleavage in hinge 1 (H1) and hinge 2 (H2) sites by calpain. Carboxyl-terminal (CT) fragment of the cytoskeletal protein FLNA transports to the cell nucleus and stimulates cell transcription. Calpeptin is a calpain 1 and 2 inhibitor, which is responsible for FLNA cleavage. Identification of FLNA^{CT} roles in cell migration and invasion may help to develop more effective cancer therapies.

Method: Human melanoma (A7), prostate cancer (PC3), mouse fibrosarcoma (T241) and endothelial (MS1) cells were assayed for proliferation, migration, invasion and colony formation after treatment with calpeptin.

Results: In all cell lines, for calpeptin treated group we found less migration, invasion, proliferation and colony forming ability compared to the controls.

Conclusion: The result of this study showed that calpeptin reduces FLNA^{CT} production by calpain cleavage in multiple cancer cells that express FLNA. On the other hand, cells with reduced FLNA^{CT} production showed significantly ($p < 0.05$) less migration, invasion, proliferation and colony forming ability. These data suggest that FLNA^{CT} is one of the important regulators in cell proliferation, migration, invasion and colony forming.

This experimental study was carried out through 2014-2017 in Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, Institute of Biomedicine, University of Gothenburg.

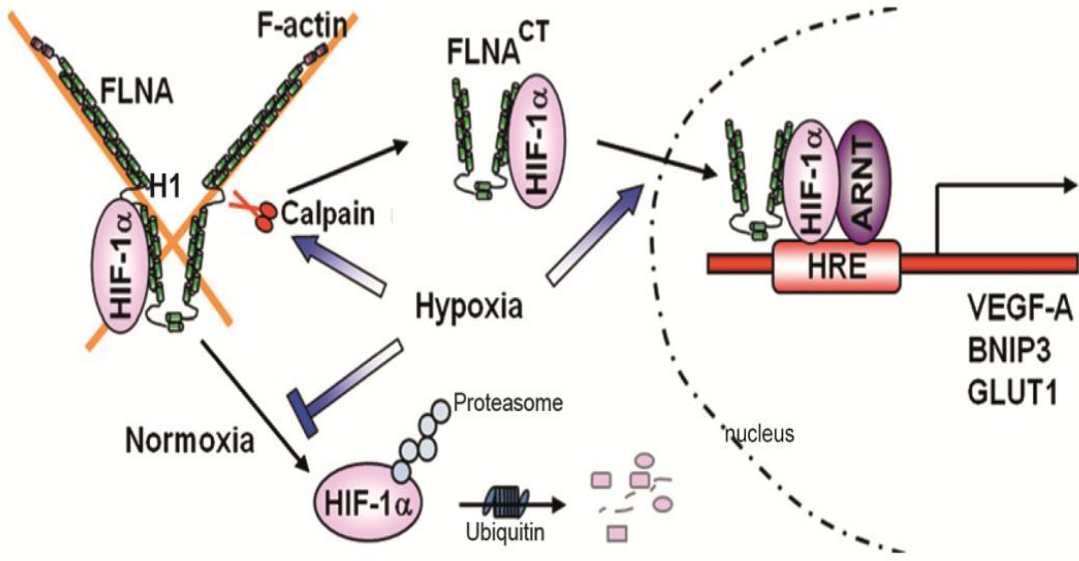
Key Words: Filamin, Filamin A, Calpain, Calpeptin, Prolifiration, Migration, Invasion, Colony Forming, Cancer.



1.GİRİŞ VE AMAC

Filaminler, yaygın bir şekilde eksprese edilen büyük, aktin bağlayıcı proteinlerdir ve F-aktinin üç boyutlu yapısını stabilize ederek hücre zarına bağlanmasını sağlarlar. Filaminler, hücre yüzeyinde bulunan reseptörleri sararak, mekanik dayanıklılık sağlarlar ve böylece hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarını koruyarak, hücrenel hareket sırasında stres sinyallerinin aktin ağlarına iletimini sağlarlar (1).

Memelilerde üç filamin geni vardır: Bunlar, FLNA, FLNB ve FLNC'dır. FLNA ve FLNB yaygın olarak dokularda, FLNC ise ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kasında eksprese olur. FLNA en yaygın bulunan izoformdur ve en çok insan dokularında eksprese olan bir varyanttır. FLNA iki monomerden oluşan bir homodimerdir. Her bir monomer bir aktin bağlayıcı N-terminal ve 24 tekrardan oluşan rod-domain içermektedir. Bu iki bölge iki kısa menteşe (menteşe 1 ve 2) ile bağlanmaktadır. FLNA kesimi bu iki bölgeden yapılıdır. Kalpain, tercihen menteşe 1 ve 2 (H1 ve H2) bölgesinden FLNA'yı keser (Şekil 1) ve endojen olarak FLNA^{CT}yi üretir (2). Hipoksi koşulların varlığı da kalpain aktivitesini indükler (3). Elde edilen son veriler, FLNA'nın hücrenel sinyal iletiminde düzenleyici bir role sahip olduğunu göstermektedir. Endojen olarak üretilen FLNA^{CT} nin ise hücre çekirdeğinde, bir nükleer transkripsiyon modülatörü olarak görev yaptığını göstermiştir (4). Kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneği artmaktadır. Bu sebeple kanserli hücrelerin bozulan bu özelliklerine sebep olan mekanizmaları saptamak ve bu hücreleri, normal hücrelerin normal gelişim özelliklerine yaklaştırmak için çok sayıda çalışma yapılmakta ve bunun için de çeşitli ilaçlar ve sinyal ileti yolları araştırılmaktadır.



Şekil 1. HIF-1 α fonksiyonunun FLNA tarafından düzenlenmesi (5). Filamin A sitoplazmada, hipoksi indükleyici faktörler olan HIF-1 α ve HIF-2 α ' dan sadece HIF-1 α ile etkileşir. Bu etkileşimin tümör büyümesini ve angiogenezi arttırdığı saptanmıştır. Hipoksi durumu, kalpain proteaz aktivitesinin artmasını ve bunun bir sonucu olarak da FLNA' nın C terminal ucundan kesilmesini indüklemektedir. Bu durum FLNA'nın kesilmesinin ve kesilen fragman FLNA^{CT} nin de üretiminin artmasına neden olur. Üretimi artan FLNA^{CT} ile HIF-1 α fiziksel etkileşmeye girerek kolayca hücre çekirdeğine transloke olurlar. Sonuç olarak, hipoksi durumunda FLNA^{CT}, HIF-1 α molekülüne transkripsiyonel bir koaktivatör görevi yaparak HIF-1 α 'nın hücre çekirdeğindeki transaktivasyon işlevini arttırmaktadır (5).

Bu araştırmanın temel amacı, proteolitik bir enzim olan kalpain' i bloke ederek, kanser hücrelerinde FLNA'nın kesilmesini durdurmak ve bunun bir sonucu olarak da kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektir. FLNA hücrenin sitoplazmasında, karboksi terminal ucundan kesildiği zaman hücre içinde FLNA^{CT} üretimi artar. Kalpeptin ise bu kesilmeyi engelleyecek olan bir kalpain inhibitörüdür. Kalpeptin'in hücre membranından kolayca geçebilmesi, kalpain 1 ve 2'yi spesifik olarak inhibe edebilmesi, diğer kalpain inhibitörlerine kıyasla daha az sayıda farklı proteinle etkileşime girmesi ve düşük IC₅₀ 'ye (5-8 nM) (6,7) sahip olması gibi avantajları nedeniyle, kalpain inhibitörü olarak seçilmiştir.

Eğer hücre içinde FLNA^{CT} üretimi artarsa kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu da artacaktır. Bu hipotezimizi doğrulamak için, dört farklı hücre hattı için [A7 (human Melanoma cell), PC3 (human prostate cancer), T241 (mouse fibrosarcoma), MS1 (Mouse endothelial)] hazırladığımız deney gruplarında (kalpeptinle tedavi edilmiş ve kalpeptinle etkileştirilmemiş olan hücre grupları), hücresel proliferasyon, migrasyon, invazyon ve hücre koloni oluşturma özelliklerini test etmeyi amaçladık. Önerimizin doğru olması durumunda, test edilecek olan bu parametrelerde mutlaka bir değişikliğin olması gerekecekti. Gerçekten de kullandığımız dört farklı hücre hattı ile yapmış olduğumuz deneysel çalışmaların sonunda elde etmiş olduğumuz verilerin, ileri sürdüğümüz hipotezi desteklediğini gözlemledik.

2. GENEL BİLGİLER

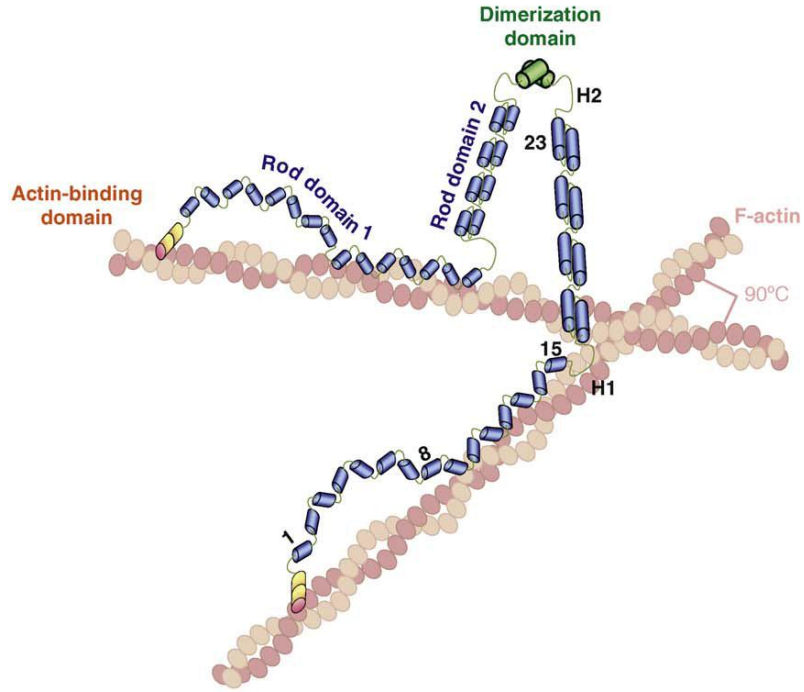
2.1. Filaminler

Kas hücrelerinin en önemli proteinlerinden biri olan aktin, globüler (G-aktin) ve filamentöz (F-aktin) monomerlerinden oluşmuştur. Aktin sadece hücre iskeletinin oluşumu ve hücre şeklinin korunması için değil, aynı zamanda dış uyaranlara yanıt olarak, hücre morfolojisi ve lokomasyonunun düzenlenmesi için de gereklidir. Bu dinamik yapının sürekli olarak şekillendirilmesi, çok sayıda aktin bağlayıcı protein aracılığıyla (actin-binding proteins ABP) olmaktadır. Bu aktin bağlayıcı proteinlerden biri de filaminler'dir. Filamin ailesi üç homolog proteinden (FLNA, FLNB ve FLNC) oluşmaktadır. Bunlar farklı genlerin ürünleridir ve ayrıca mRNA dizi varyantları da farklıdır. İnsan FLNA genleri de fare Flna genleri de, X kromozomları üzerinde bulunmaktadır. İnsan FLNB ve FLNC filaminleri sırasıyla otozomal kromozom 3 ve 7 üzerinde, fare Flnb ve Flnc filaminleri ise sırasıyla 14 ve 6 numaralı kromozomlarda bulunurlar. Yetişkinlerde, FLNA en bol bulunan izoformdur. FLNC ise baskın olarak iskelet ve kalp kası hücrelerinde eksprese edilir (4). ABP, filamin alt biriminin F-aktin'e bağlamasında anahtar işlevi görür. Filamin alt birimi, Ca²⁺-kalmmodulin ile kompetitif yarışarak ABP'ne bağlanır ve F-aktin'den ayrışır (8). Filaminler, F-aktin ağlarının üç boyutlu yapılarını stabilize ederler. Ayrıca, transmembran reseptörlerine veya iyon kanallarına bağlanarak hücreler arası tutunma (adezyon), hücre hareketi (migrasyon) ve hücrenin varlığını sürdürmesi (progresyon) gibi fonksiyonlarda önemli rol oynarlar (9). Filaminlerin mekanik özellikleri, dinamik ortogonal F-aktin ağları (network) ile sağlanır. Bu ağ yapısı, membran bütünlüğü koruyarak hücreleri mekanik strese korur. F-aktin de dahil olmak üzere filaminler, 70 ten fazla farklı hücre proteinine bağlanırlar. Örneğin bunlardan transmembran reseptörlere ve sinyal moleküllerine bağlanarak, hücre için gerekli olan yeterli desteği (scaffolding fonksiyonlarını) sağlar ve çoklu hücre davranışları entegre ederler. İnsanlarda filaminlerin sayılamayacak kadar çok işlevleri vardır. Bu nedenle, filamin genlerinde oluşacak zararlı mutasyonlar beyin, iskelet ve kalp gibi organlarda geniş bir gelişimsel malformasyona neden olur(10).

2.2. Filamin A (FLNA)

FLNA geninin ekspresyonu ile oluşan filamin A'nın hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimi hücreye mekanik stabilite sağlar, hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarını korur ve stres sinyallerini hücrenin hareketi sırasında aktin iskeletine iletir. Filamin A'nın başlıca bağlandığı protein aktin'dir. Bu bağlanma ile aktin proteininin, filamanlardan oluşan dallanmış bir hücresel iskelet ağı oluşturmasına yardım eder. FLNA bundan başka, sinyal iletiminde yer alan geniş bir protein yelpazesıyla de etkileşime girebilme özelliğine sahiptir (4,9).

FLNA iki kalponin homologundan (CH) oluşan 280 kDa molekül ağırlıklı bir homodimerdir (şekil 2). Her monomerik zincirin N-terminal ucunda (NT) bir F-aktin-bağlayıcı bölge (domain) vardır ve 24 homologun tekrarından oluşan immünoglobülin (Ig) benzeri bir çubuk segmenti yapısı gösterir (11,12). Her bir segment yaklaşık 96 amino asit içermektedir. İki menteşeli (Hing) bölge, 24 Ig-benzeri tekrarları, iki çubuk bölgesine ayırır. Bu iki menteşeden biri (menteşe 1, H1), 15. ve 16. Ig-benzeri tekrarlar arasında ve C-terminal (CT) aktin bağlama ucunda yer alır. Diğer menteşe (menteşe 2, H2) ise N-terminal dimerleşme bölgesi olan 23. ve 24. Ig-benzeri tekrarlar arasında bulunmaktadır (4,13).

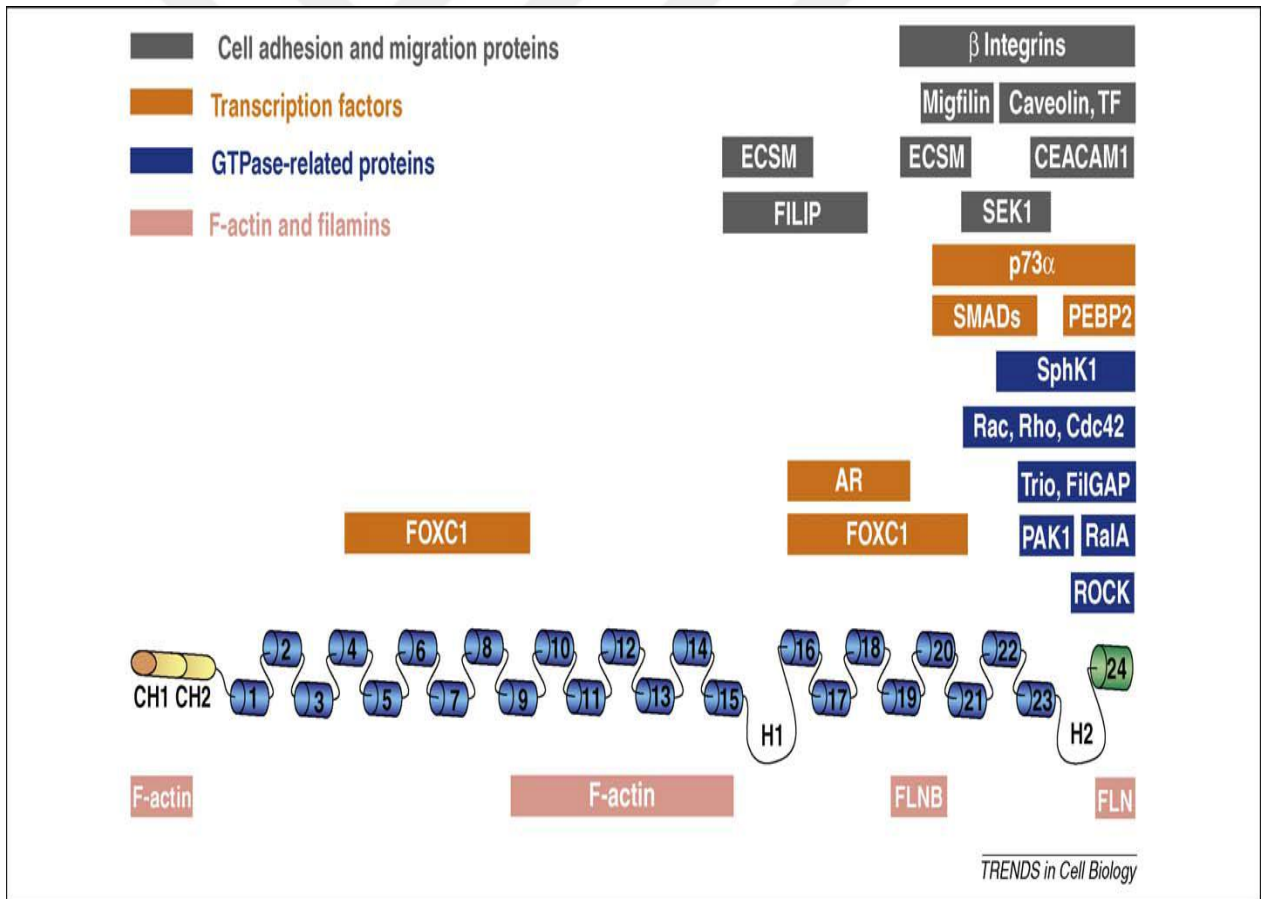


TRENDS in Cell Biology

Şekil 2. FLNA'nın filamentöz aktin ile etkileşimi için önerilen bir model (4).

Rod domain 1 (aktin bağlama bölgesi)'de bulunan Ig-benzeri 9-15 tekrarları, yüksek avidite göstermeleri nedeniyle F-aktin bağlanmasını kolaylaştırır. Rod domain 2 ise, partnerleri ile ortak etkileşimler kurmak için alan barındırmaktadır (Şekil 3).

Filamin'in N ucundaki aktin bağlama alanı, iki kalponin homologu olan domain CH1 ve CH2 içerir. Aktin bağlanma alanını takip eden ve 24 tekrardan oluşan kısım, anti paralel olarak β -tabakalarına katlanır ve protein-protein etkileşimleri için ara yüz olarak işlev görür. FLNA'ya bağlanan ortakların çoğunluğu C- terminalinde FLNA ile etkileşime girer. Şekil 3 de, FLNA ile doğrudan etkileşime giren seçilmiş bir protein koleksiyonu sunulmaktadır (4).



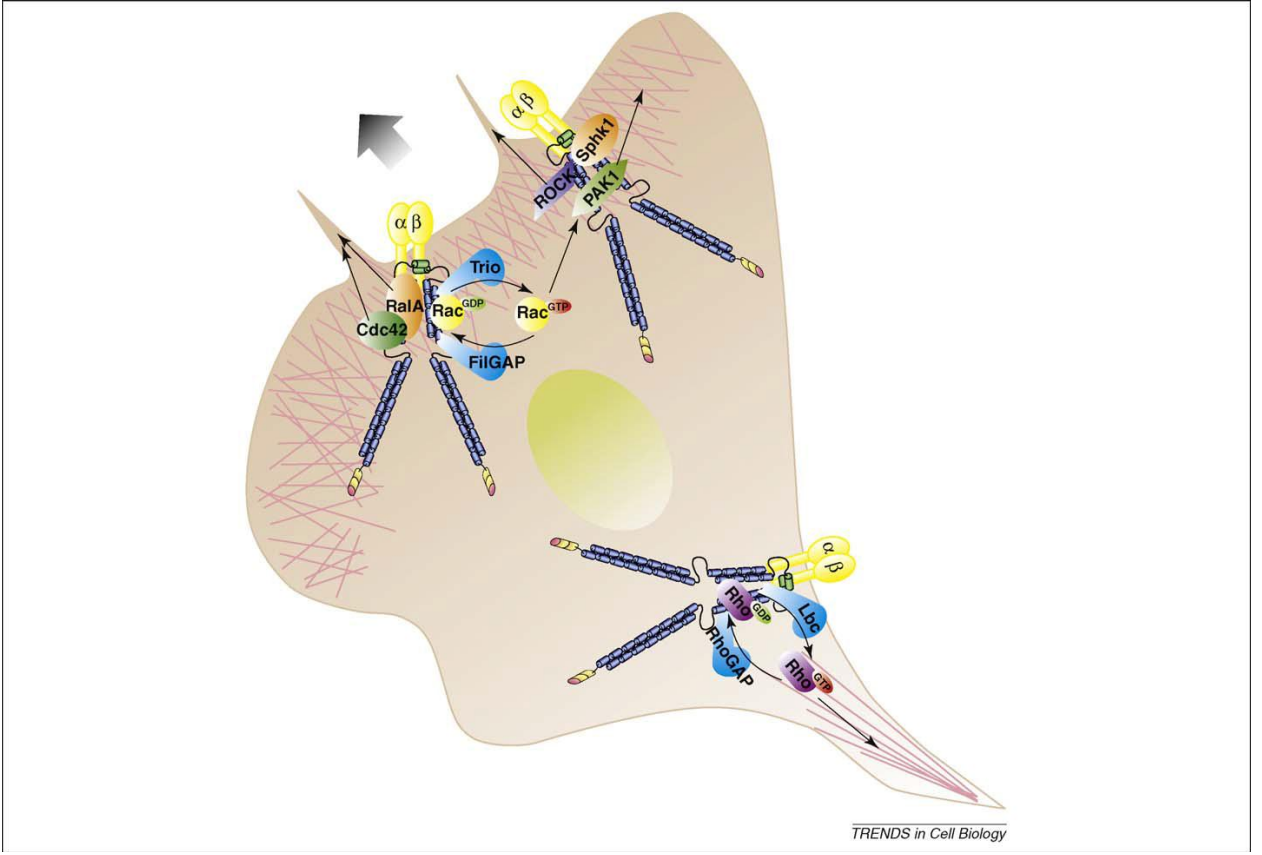
Şekil 3. FLNA'nin monomerik yapısı ve FLNA ile etkileşimde olan proteinler (4).

2.3. Filaminler ve Hücre Motilitesi

Her üç filamin de hücre gelişimi süresince yaygın olarak ifade edilmektedir. Yönlendirilmiş hücre hareketi hem embriyonik gelişimde hem de homeostaz için gereklidir. Düzensiz ve hatalı hücre göçü, vasküler hastalıklar, kronik inflamatuvar hastalıklar, tümör oluşumu ve metastaz dâhil birçok patolojik süreçlere yol açar. Filaminler, polarize olmuş hareketli hücrelerin hem ön hem de arka kenarlarında yerleşerek, aktin sitoskeleton yapısının yeniden şekillenmesini doğrudan doğruya regüle ederler. Böylece hücrelerin sitoplazmik çıkıntılarının ileri ve geri çekilme doğasını etkilerler. Mekânsal dağılım, ifade düzeyi ve filamin-aktin bağlanmasına ilişkin etkileşim süreçleri, hücrenin hareketliliği sırasında F-aktin'in yeniden biçimlenmesine ve stabilize olmasına da katkıda bulunabilir. Böylece, filaminlerin hücrenin ön veya arka tarafında yer alması, migrasyonun başladığı veya bittiği yerde ortak proteinlerin, o hücrenin membran bölgelerinde toplanmasına neden olur (4).

2.4. Filaminler ve Sinyal İletimi

Filaminler sinyal iletimini küçük molekül ağırlıklı GTPazlar ile koordine ederler. Ekstraselüler matriks ligandlarına integrin bağladıktan sonra, küçük GTPazlar aktive olur ve aktin'in polimerizasyona yol açar. Bu polimerleşme, lamellipodia ve filopodia oluşumu ile sonuçlanır. Memeli hücrelerinde aktin-bazlı dinamik hareketli yapılar küçük GTPazlar'dan olan Rho ailesi tarafından düzenlenir. Filamin A, Rac, Rho, Cdc42 ve RalA gibi küçük GTPaz-bağlı proteinlerle ve ayrıca GTPazların upstream ve downstream faktörleri ile etkileşir. Bu etkileşimler, FLNA'nın CT bölgesi içindeki 23. ve 24. tekrarları arasında gerçekleşir (şekil 4). Filamin'in CT bölgesi, integrinlerin sitoplazmik kuyruklarına ve diğer membrana gömülmüş glikoproteinlere bağlanarak plazma zarında yan yana dizilmiştir. Bu etkileşimler GTPaz aktivitesinin çok hassas bir şekilde düzenlenmesi ile gerçekleşir (14,15).



Şekil 4. FLNA, hücre hareketliliği sırasında küçük GTPazlar için bir iskelet sağlar. Hareketli hücrelerin ön kenarındaki tabakalı membran, FLNA tarafından oluşturulan aktin demetlerinin ve ağlarının toplanması ve yeniden düzenlenmesini içeren bir seri kompleks hareketlerde önemli bir rol oynamaktadır. FLNA, aktin filamentlerini çapraz bağlar. Trans membran proteinlerini (β -integrinler) ise, küçük GTPazlar (Cdc42, Rho, Rac, RalA) ve bunların upstream (Trio, Lbc, FilGAP, RhoGAP) ve downstream (ROCK, PAK1) yöndeki faktörlerine bağlamaktadır (4).

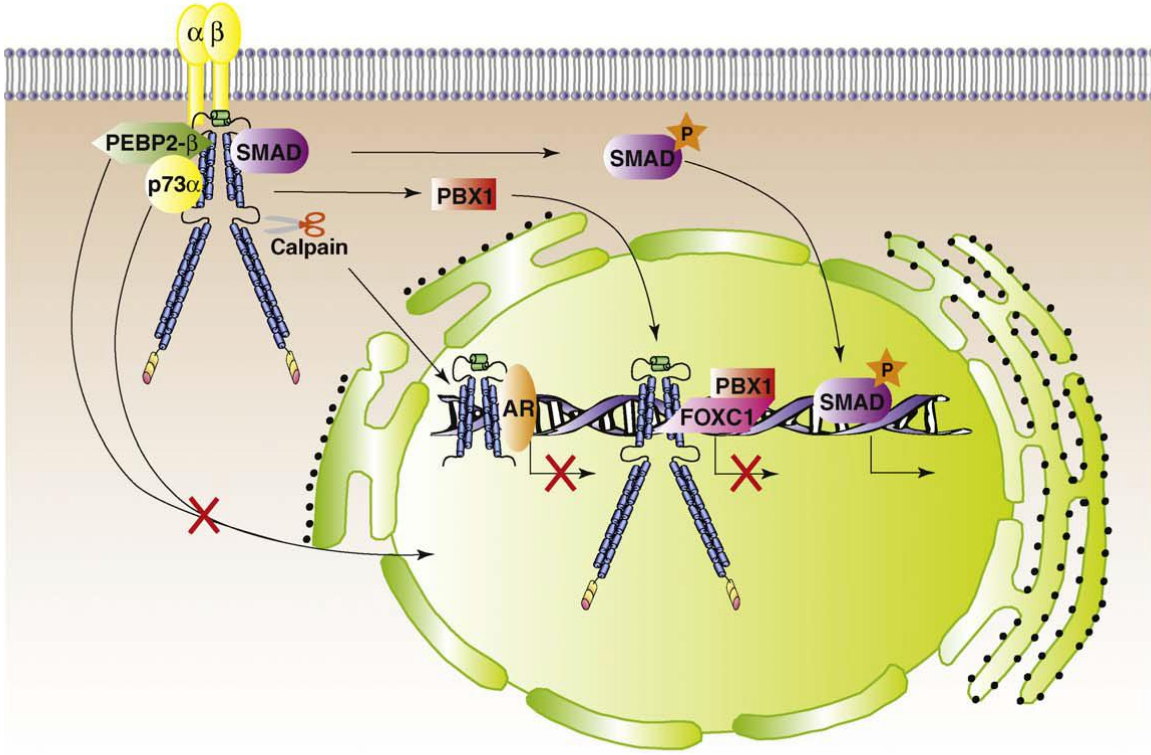
2.5. Filaminler ve Transkripsiyonun Düzenlenmesindeki Rollerini

Filaminlerin transkripsiyon üzerinde hem pozitif hem de negatif etkileri vardır. Filaminler ile transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi, filaminlerin sitoplazmadaki transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu veya inaktivasyonu yoluyla gerçekleşir (şekil 5).

Hücre sitoplazmasında FLNA'nın PEBP2 β /CBF β , PEBP2/CBF gibi transkripsiyon faktörlerinin heterodimerik bir altbirime veya p73 gibi bir transkripsiyon düzenleyicisine bağlanması, transkripsiyonel baskıyı gösterir ve bu molekülleri sitoplazmada tutar (16, 17). Diğer yandan reseptöre gelen sinyallerin alınmasıyla birlikte, FLNA'nın, SMAD2 ve SMAD5 gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile olan etkileşimi de, pozitif yönde reseptör-bağımlı olarak indüklenen fosforilasyonu ve dolayısıyla SMAD moleküllerinin da hücre çekirdeğindeki birikimi düzenler (18). İlginçtir, hücre içindeki bütün FLNA'nın sadece küçük bir fraksiyonu insan deri fibroblast ve HeLa (Henrietta Lacks) kanser hücrelerinin çekirdeğinde bulunmuştur. DNA hasarında önemli bir rolü olan tümör süpresör gen BRCA2 ile FLNA'nın nükleus içinde etkileşiminin olması da sitoskeletal sinyal ileti yolağının, DNA hasarından sorumlu olan yollar ile bağlantılı olduğu göstermiştir. (19). Bu beklenmedik bulgu, FLNA'nın, çekirdeğin transkripsiyon faktörlerini etkileyebileceği ihtimalini arttırmaktadır. Ayrıca FOXC1'in transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesi sırasında, hem FLNA hem de transkripsiyonu düzenlemede görevli moleküllerden PBX1 ile çoklu etkileşimlerde bulunması da keza sitoskeletal sinyal ileti yolağının, DNA hasarına sebep olan yollardan biri olduğunu göstermiştir (20). Tam uzunluğunda olan (kesilmemiş) FLNA, verimli bir şekilde PBX1'i çekirdeğe taşır ve FOXC1-PBX1 transkripsiyon-inhibisyon kompleksi oluşur. Bununla birlikte, FLNA'nın nükleer transportu hala tartışmalıdır.

Androjene bağımlı prostat kanseri hücrelerinde, kalpain bölünmesiyle üretilen 90 kDa'lık bir proteolitik FLNA fragmanı çekirdeğe yerleşirken, androjene bağımlı olmayan alt hücre hattında FLNA parçalanamaz ve sitoplazmada kalır (21). Saptama sınırının altında olan az miktarda tam uzunlukta FLNA'nın çekirdekte olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Çekirdekte parçalanmış FLNA'nın gözlenmesi, kalpainle parçalanmış FLNA parçasının, cinsel farklılaşmayı düzenleyen ve bir transkripsiyon faktörü olan androjen reseptörünün (AR) nükleer translokasyonunu kolaylaştırdığı bulgusu ile tutarlıdır. FLNA fragmanının nükleus içindeki

varlığı, AR'nin interdomain etkileşimlerini ve koaktivatör bağlanmasını etkiler ve böylelikle de AR'nin transaktivasyon aktivitesini baskılar (22, 23).



Şekil 5. FLNA ve nükleer proteinler arasındaki etkileşimler için önerilen şematik model.

FLNA, sitoplazmada PEBP2-β ve p73a'yı tutar, böylece bunların nükleer translokasyonunu ve transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. Calpain bölünmesiyle üretilen FLNA'nın proteolitik kısmı AR ile nükleer bir ön başlatma kompleksi oluşturur ve AR trans-aktivasyonunu baskı altına alır. Tam uzunlukta olan FLNA, PBX1'in nükleusa taşınmasını artırır. Çekirdekteki FOXC1/PBX1 inhibitör kompleksi için bir iskelet ortamı sağlar ve böylece FOXC1'i inaktif hale getirir. FLNA, SMAD proteinini fosforilleyerek nükleusa taşınmasını kolaylaştırır (4).

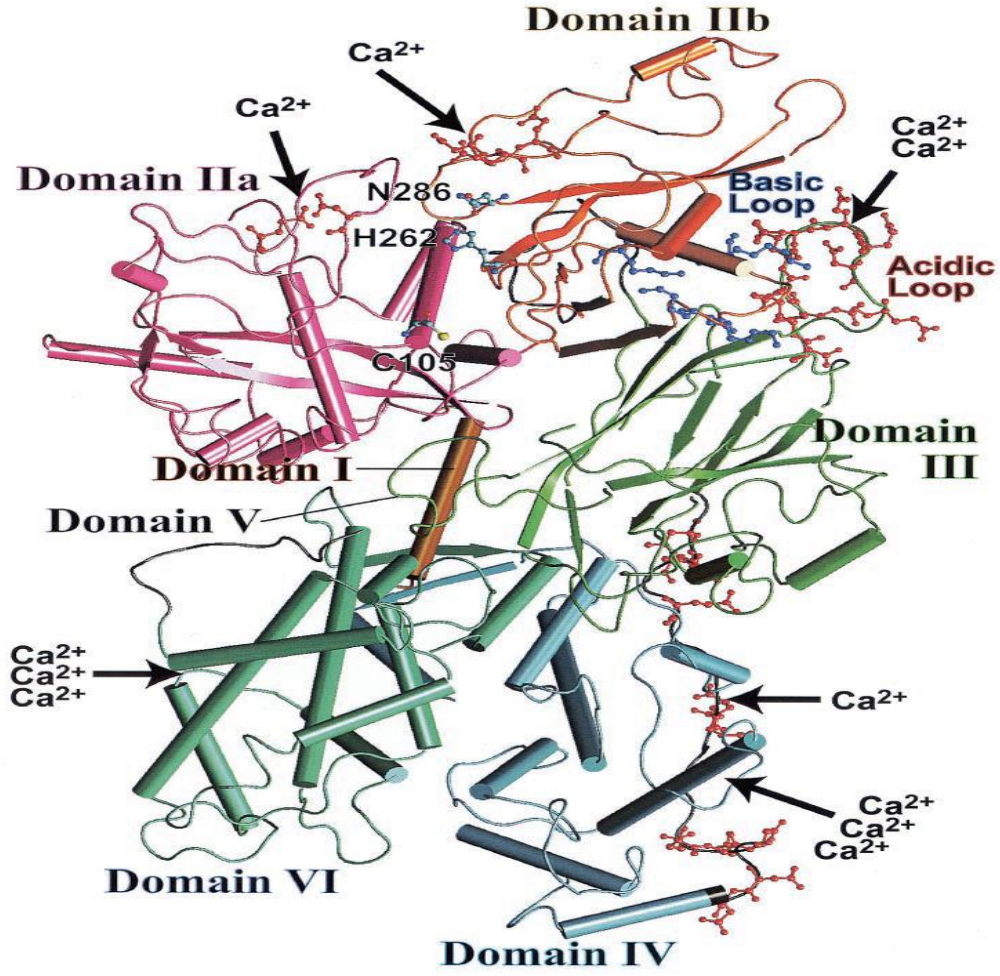
2.6. Kalpain ve Kalpeptin

Kalpainer, kalsiyum bağımlı, lizozomal olmayan bir sistein proteaz ailesidir (şekil 6) ve insanda 14 tane kalpain çeşidi çok iyi bilinmektedir (şekil 7). Yapı ve fonksiyona göre, kalpain 1 (μ -kalpain) ve kalpain 2 (m-kalpain) iyi karakterize edilmiştir (24). Normal hücre fonksiyonlarda (hücre hareketliliği, hücre döngüsü, otofaji ve apoptoz) ve patolojik süreçlerde (tümörigenez, kanser metastazı ve nörodejeneratif hastalıklar) kalpainlerin kritik rolleri vardır ve bu fonksiyon ve süreçleri destekleyecek birçok deneysel ve klinik çalışma bulunmaktadır (24, 25). Örneğin insan kolorektal kanserinde, kalpain 2'nin aşırı eksprese olduğu saptanmıştır (26). Başka bir çalışmada da kalpain 1 ekspresyonu artmış schwannomalar ve meningiomların olduğu bildirilmiştir (27). Bununla birlikte, prostat kanseri sonuçları halen tartışmalıdır (28,29). FLNA, kalpain 1 ve 2'nin doğal bir substratıdır. FLNA'nın H1 bölgesinden kalpain tarafından kesilmesi sonucunda, 170 ve 110 kDa'lık iki fragman oluşur. H2 alanını da içeren 110 kDa'lık fragmanı tekrar H2 bölgesinden kesildiğinde 90 kDa'lık fragman elde edilir ki bu fragmanın hücre çekirdeğine translokasyon yaptığı saptanmıştır (21). FLNA ile androjen reseptörün (AR) etkileşim sürecinde, Şekil 5'de de tartışıldığı üzere, uzun vadeli androjen yoksunluğunda, androjene duyarlı prostat kanseri hücrelerini, kesilmiş olan FLNA fragmanı, AR-negatif dönüştürebilir. Bu da daha agresif ve androjenden bağımsız bir bozukluğa neden olabilir. Bu durum kalpain 2'nin aktivasyonunu artırarak daha fazla eksprese olmasına sebep olur. Dolayısıyla, kalpain 1/2 inhibitörü ile kombine edilecek olan androjen yoksunluğu, prostat kanserinin progresyonunu önlemek veya geciktirmek için yeni bir terapötik strateji sağlayabilir.

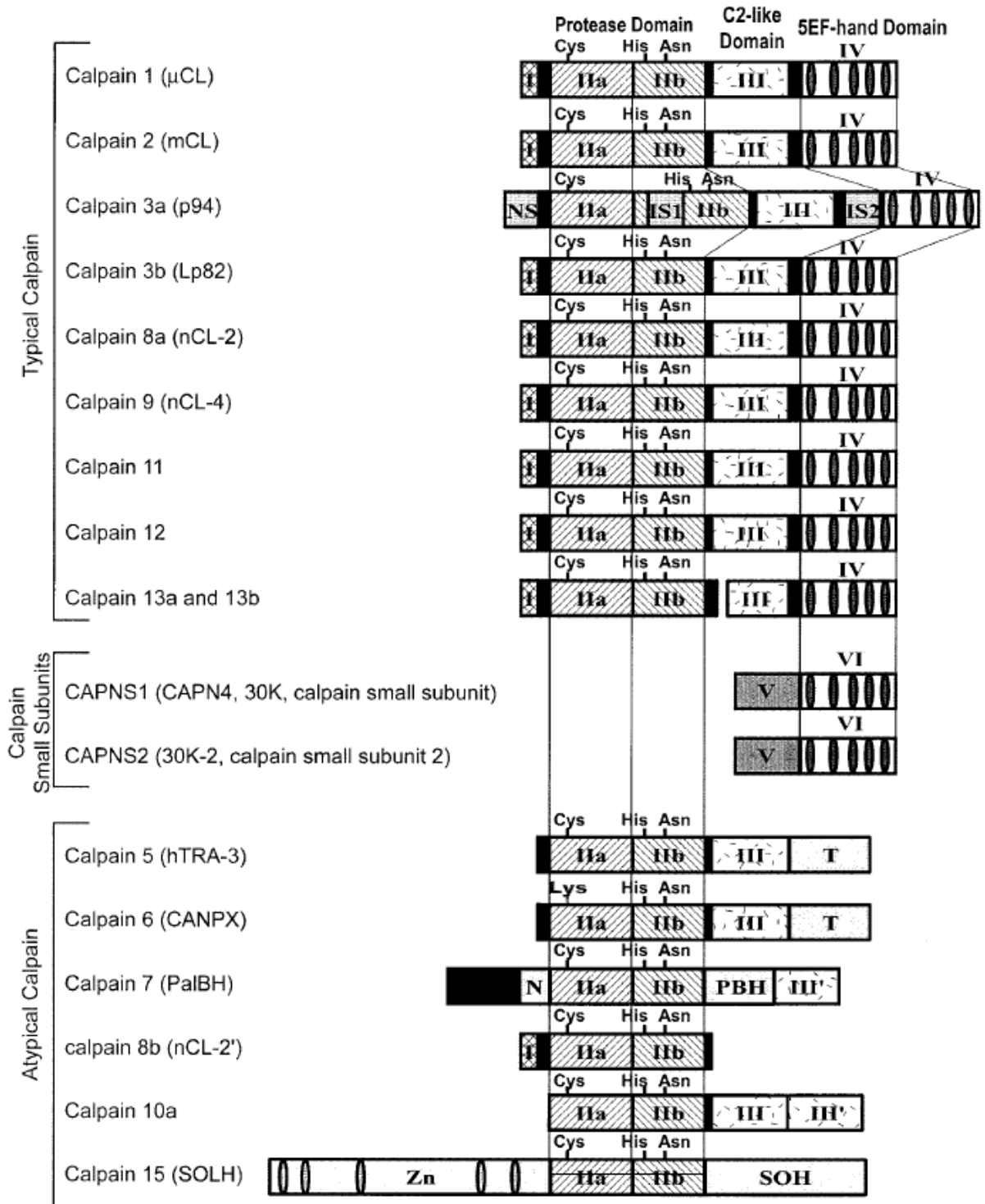
Nitekim Liu T ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada insan prostat kanseri hücrelerinde, uzun süreli androjen yoksunluğu oluşturmuşlar ve bu androjen yoksunluğunun kalpain 1'in değil, Filamin A'nın ve kalpain 2'nin aşırı ekspresyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Dolayısıyla, kalpain 2'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak FLNA^{CT} üretiminin de arttığını, bu artışın kalpeptin ile inhibe edilebildiğini ifade etmişlerdir (29,30,31). Ayrıca hücre içinde FLNA regülasyonunun azalması, mitojen ile aktive olan protein kinaz, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz- kaskad yoluyla, kalpain aktivitesini artırır ve fokal adezyon (FA) proteinlerinin bölünmesini uyarır. Kalpain sitoplazmik bir sistein proteazdır ve aktivitesi için kalsiyum iyonlarına gereksinim duyar. Fizyolojik fonksiyonu halen tam olarak anlaşılmamış

olmasına rağmen kalpain'nin sinyal iletimi, hücre proliferasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi, farklılaşma, apoptoz, membran füzyonu ve trombosit aktivasyonu gibi çeşitli kalsiyum ile düzenlenen hücresel süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (32-36). Doku örneklerine, dietilaminoetil kolon kromatografisi ile ayırma işlemi uygulandığında, iki kalpain aktivitesi tespit edilir. Bunlar; memelilerdeki iki geleneksel kalpain türüne karşılık gelen μ -kalpain ve m-kalpain'dir. Bu kalpainlerin kalsiyuma olan duyarlılıklarının farklı olduğu belirtilmiş olup, in vitro koşullarda yapılan denemeler sonucunda, kalsiyum duyarlılıklarının, sırasıyla litrede mikromol ve milimol Ca^{2+} civarında olduğu saptanmıştır. Bu kalpainler, büyük bir 80 kDa katalitik altbirim (80kDa CAPN1 ve CAPN2 tarafından kodlanmış) ve ortak bir 30 kDa düzenleyici altbirimden (30kDa, CAPN4 tarafından kodlanmış) oluşan heterodimerlerdirler. 80kDa ve 30kDa sırasıyla dört (I-IV) ve iki (V ve VI) domain içerir. II nolu proteaz domeyni diğer sistein proteazları gibi (B ve L katepsinlerde olduğu gibi), substrat bağlayıcı yarığı bulunan iki alt domain (IIa ve IIb) içerir (37-40). Kalpain, sitozolde inaktif bir enzim olarak bulunur ve hücresel Ca^{2+} düzeyindeki artışa yanıt olarak membranlara translokasyon yapar. Membranda kalpain, Ca^{2+} ve fosfolipidlerin varlığında etkinleştirilir. Domain I'in otokatalitik hidrolizi, aktivasyon sırasında gerçekleşir ve sonuç olarak 30 kDa ve 80 kDa birimlerine ayrılır (şekil 8).

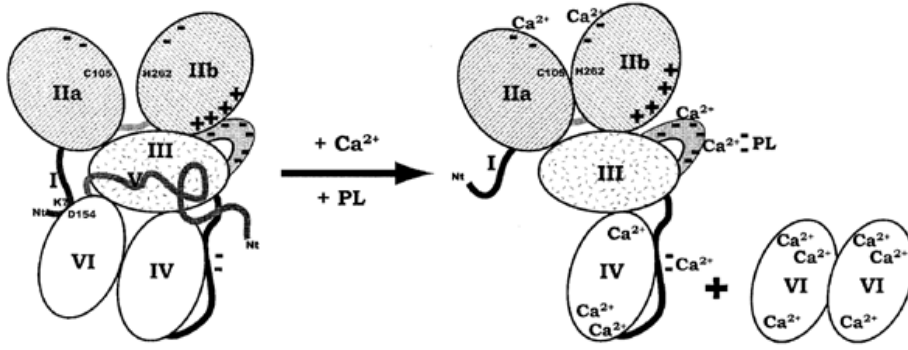
Aktifleşmiş kalpain (80 kDa birimi), substrat proteinlerini membranlarda veya membranlardan serbest bırakıldıktan sonra sitozolde hidroliz eder (41). Ca^{2+} yokluğunda, iki proteaz alt birimi IIa ve IIb, alan etkileşimi tarafından dayatılan yapısal kısıtlamalarla birbirlerinden ayrılır. Ca^{2+} ile indüklenen yapısal değişiklikler, aktivasyon için bir işlevsel katalitik bölge oluşturmak için ön şarttır (37,38,39,42). m-kalpain'de en az üç farklı Ca^{2+} bağlanma bölgesi mevcuttur, ikisi kalmodulin benzeri bölgeler IV ve VI, üçüncüsü ise asidik halka bölgesinde C2 benzeri domain III'te ve proteaz II bölgesinde bulunmaktadır (39,40,42).



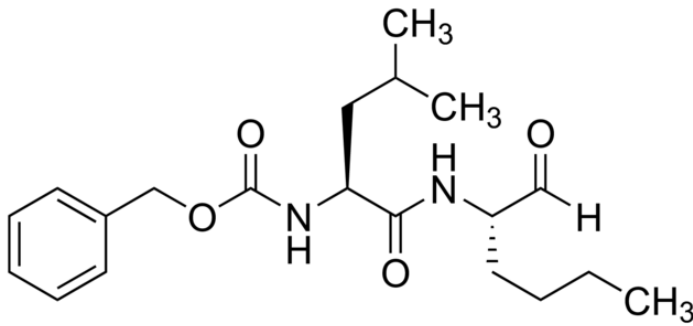
Şekil 6. Ca²⁺ içermeyen insan m-kalpain molekülünün üç boyutlu yapısı (43).



Şekil 7. İnsan kalpain aile üyelerinin altbirim yapıları (43).



Şekil 8. Kalpain'in Ca²⁺ ile aktivasyon mekanizması (43).



Şelik 9. Kalpeptin, bir kalpain 1 (μ -kalpain) ve kalpain 2 (m-Kalpain) inhibitörüdür (44).

Kalpeptin hücre membranından geçebilen, kalpainleri spesifik olarak inhibe etmek ve fizyolojik rollerini değerlendirmek için geliştirilmiş etken bir kimyasaldır (45). Kalpeptinle ilgili olarak yapılan birçok çalışmada, kalpeptin'in hücre membranından kolayca geçebildiği, kalpain 1 ve 2'yi spesifik olarak inhibe edebildiği, diğer kalpain inhibitörlerine kıyasla daha az sayıda farklı proteinle etkileşime girdiği ve çok düşük IC₅₀ (5-8 nM) değerine sahip olduğu bilgileri mevcuttur (6,7,46,48). Bütün bu avantajları nedeniyle kalpeptin, bu çalışmamız için uygun bir kalpain inhibitörü olarak görülmüş ve seçilmiştir.

Sonuç olarak filaminler üzerine yapılan birçok çalışmada, FLNA'nın işlev ve ifadesine odaklanılmıştır fakat FLNA'nın bölünmesinin önemi ve tümör hücrelerinde FLNA^{CT} üretiminin önemi hakkında daha az bilgi bilinmektedir. Buna ek olarak FLNA^{CT1}'nin, tümör hücresinin migrasyonu, invazyonu ve proliferasyonundaki spesifik rolü hakkında çok az bilgi vardır ve net değildir. Biz bu alışmamızda FLNA^{CT1}'nin daha önce çalışılmamış olan insan ve fare kanseri hücrelerindeki işlevini araştırarak literatüre yeni bilgiler kazandırdık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırma, 2014 Nisan ayında başlayarak, 2017 Aralık ayına kadar sürmüştür. Araştırmanın deneysel bölümü Göteborg Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Hücre Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Araştırmada A7 (İnsan Melanoma), PC3 (İnsan prostat kanser), T241 (Fare fibrosarkoma) ve MS1 (Fare endotel) hücre hatları kullanılmıştır.

Çalışma grupları:

1. Deney grubu (Kalpeptin eklenmiş olan gruplar)
2. Kontrol grubu (DMSO eklenmiş olan gruplar)

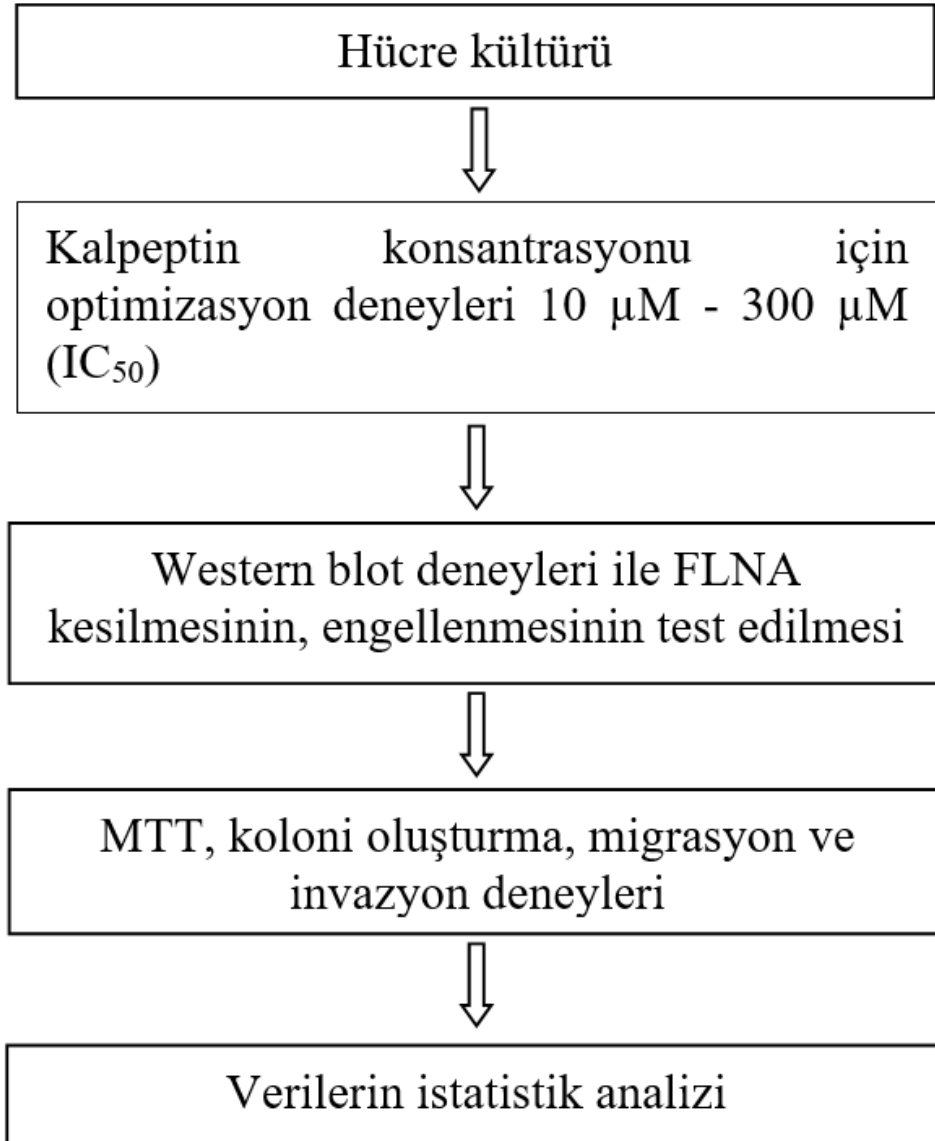
3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada A7 insan Melanoma hücre hattı için *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), T241 fare fibrosarkoma ve PC3 insan prostat kanser hücre hattı için RPMI-1640 ve MS1 fare endotel hücre hattı için *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ortamı kullanıldı. Kalpeptin *Sigma-Aldrich*'den temin edildi.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Kalpain ve FLNA kesilmesinin engellenmesi araştırmanın bağımsız, hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve koloni oluşturması ise bağımlı değişkenleridir.

Deneylerin akış şeması



3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Çözülmesi

-18°C de tutulan hücreleri çözmek için aşağıdaki işlemler yapıldı;

1. Ekimden önce 1 mL/5 cm² hacimdeki kültür ortamı 37° C' de, %5 CO₂ içeren inkübatörde (*Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO₂*) en az 30 dakika süreyle bekletildi,
2. Hücreler 37° C sıcaklıktaki su banyosunda hızlıca çözüldü,
3. Hücre süspansiyonu üzerine serumlu ortam eklenip pipetleme yapıldı,
4. Hücre sayımı yapıldı,
5. Önceden kültür kaplarında (25 lik flask) inkübatörde bekletilen ortamlar üzerine 5000/cm² yoğunlukta ekim yapıldı.
6. Faz kontrast mikroskopunda (*Olympus, CK40*) incelendikten sonra inkübatöre konuldu.
7. Kültür ortamı ekimin ertesi günü ve ardından gelen iki günde bir taze kültür ortamıyla değiştirildi.

3.6.2. Hücre Kültürü

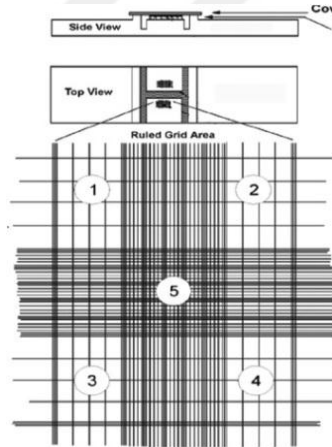
Çalışmada A7, PC3, T241 ve MS1 hücre hatları (ATCC) kullanıldı. A7 insan melanoma hücre hattı, *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), %10 FBS, %1 glutamine, %1 Penisillin/streptomysin ve 10 mM HEPES ile kültüre edildi. PC3 insan prostat kanser hücresi RPMI-1640, %10 FBS, %1 glutamine, %1 Penisillin/streptomysin, 10 mM HEPES ve 1 mM sodium pyruvate ile kültüre edildi. MS1 fare endotel hücre hattı *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), %5 FBS, %1 glutamine, %1 Penisillin/streptomysin ile kültüre edildi. T241 fare fibrosarkoma hücre hattı RPMI-1640, %10 FBS, %1 glutamine, %1 Penisillin/streptomysin içeren ortamda kültüre edildiler. Hücre kültürü işlemleri biyogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet (*Thermo Scientific Cabinet / MSC1.2*) içerisinde yapılırken, hücreler 37° C'de, %5 CO₂'li inkübatörde (*Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO₂*) uygun zaman aralıklarında (2 günde bir) çoğaltıldı. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapıldı ve

hücreleri kaldırmak için % 0.05 / % 0.02 oranında Tripsin/EDTA (*Etilendiamin tetraasetik asit, Biological industries, 03-051-5B*) çözeltisi kullanıldı.

3.6.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi

Kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp ve 1X PBS (*Phosphate Buffered Saline*) ile iki kere yıkama yapıldı. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırılıp, elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak tripan mavisi (*Biological industries, 03-102-1B*) ile karıştırıldıktan sonra hücreler Neubauer lamında 10 farklı alanda hemositometrik olarak sayılarak yaklaşık hücre sayısı bulundu (Şekil 10). 50 µl hücre süspansiyonu için, 100 µl 1X PBS ve 100 µl tripan mavisi kullanıldı.

$$\text{Hücre Sayımı} = \frac{\text{Toplam Hücre}}{10} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 = \text{Hücre / mL}$$



Şekil 10. Hemositometrik olarak hücre sayımında kullanılan Neubauer lamı görüntüsü

3.6.4. Westen Blot (İmmünoblot) Deneyleri

Hücreler 75'lik flasklarda, 1×10^6 hücre olacak şekilde kültüre edildikten sonra, buz üstünde ortamları uzaklaştırıldı ve iki kez PBS ile yıkandı. Ardından tekrar PBS eklendi ve santrifüj yapıldıktan sonra PBS tamponu uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 600 μ L lizis tamponu, 200 μ L fosfataz inhibitörü ve 200 μ L proteinaz inhibitörü eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından 30-60 dakika $+4$ °C de vortekslenip, 14000 rpm de 10-15 dakika santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatantın protein içeren kısmı yeni tüplere aktarıldı ve -20 °C de western blot deneyleri için bekletildi.

Western Blot Yönteminin İlkesi: Western blot jelde ayırımı yapılmış proteinlerin membrana emdirilerek ilgilenilen proteinin radyoaktif izotopla ya da flouresan boya işaretlenmiş özel antikor yardımıyla membran üzerinde belirlenmesidir. Jel bir nitroselüloz veya PVDF (poliviniliden flüorür) zarının yanına yerleştirilir ve bir elektrik akımı proteinlerin jelden membrana göç etmesine neden olur. Western blot tekniği, kompleks karışım içinden spesifik bir proteinin tanınması ve bu protein hakkında kalitatif ve semikantitatif veri elde edilmesinde kullanılır.

Western Blot Uygulama Basamakları:

A. Hücre ekstraktı hazırlama: Hücre kültüründen alınan örneklerin besi ortamı uzaklaştırılır ve soğutulmuş PBS ile yıkanır. Üzerine örnek tamponu eklenerek (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 μ g/mL Aprotinin, 5 μ g/mL Leupeptin, 5 μ g/mL Pepstatin) ;

A) Hücre ekstraktları hazırlanır.

B. Protein Ölçümü yapılır.

C. SDS-PAGE Jelleri Hazırlanır.

1. İstenilen konsantrasyonda ayırıcı jel için monomer karışımı, aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Ayırıcı (separating) Jel Hazırlanması: 0.375 M Tris, pH 8.8					
	%5	%7	%10	%12	%15
Saf su	7.5	12,7 mL	10.7	4.65 mL	3.65 mL
3 M Tris-HCl, pH 8.8	1,25 mL	2,5 mL	2,5 mL	1.25 mL	1.25 mL
%20 (w/v) SDS	0.05 mL	0,1 mL	0,1 mL	0.05 mL	0.05 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.15 mL	4,6 mL	6,6 mL	4.0 mL	5.0 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.05 mL	0,2 mL	0,2 mL	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.005 mL	0.02 mL	0,02 mL	0.005 mL	0.005 mL
Total monomer karışımı	10.005 mL	20,12mL	20,12 mL	10.005 mL	10.005 mL

Tablo1. Ayırıcı (separating) Jel İçeriği.

2. Karışım hazırlandıktan sonra jel kasete dökülür ve jelin yüzeyi izopropanol ile kaplanır.
3. Ardından 45-60 dakika polimerize olması için beklenir.
4. Jel yüzeyindeki izopropanol atılır.

Paketleyici (stacking) Jel Hazırlanması: %4.0, 0.125 M Tris, pH 6.8	
Saf su	7.35 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
20% (w/v) SDS	0.05 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.34 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.04 mL
TEMED	0.1 mL
Toplam monomer karışımı	10.13 mL

Tablo 2. Paketleyici (stacking) Jel İçeriği.

5. Paketleyici jel için yukarıdaki tablo izlenerek monomer karışımı hazırlanır.
6. Jel döküldükten sonra polimerize olmayan karışıma, jel tarakları dikkatli bir biçimde yerleştirilir.
7. Jelin polimerizasyonu için 45-60 dakika beklenir

D. Örneklerin Hazırlanması

1. Protein örnekleri 10-40 μL içinde yaklaşık 10-40 μg olacak biçimde, en az 1:4 oranında örnek tamponu ile karıştırılır.
2. 95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2-4 dakika (veya 70 derecede 15 dakika veya 100 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakika) tutulur.

E. Elektroforetik Yürütme

1. Örneklerin yüklenmesi ardından sistem kapatılır ve elektrotlar bağlanır .
2. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar düşük akımda 100 Volt gerilim uygulanır.
3. Örneğin ayırıcı jele geçmesinin ardından gerilim 150-200 Volt'a çıkarılır.
4. Voltaj değişimleri ilk denemelerde izlenir ve not alınır.
5. Yürütülen jelde brom fenol mavisi, jelin alt kısmına varınca akım kesilir ve jel tanktan uzaklaştırılır.

F. Semi-Dry Transfer

1. Transferde kullanılacak membran 10 dakika metanol ile muamele edilir.
2. Filtre kâğıtları Towbin transfer tamponu ile ıslatılmak için muamele edilir.

10X Towbin Transfer Tamponu	
Tris	30 g
Glisin	144 g
SDS (%10)	20 mL
Distile su	800 mL'ye tamamlanır
Metanol	200 mL eklenir (kullanılacağı zaman)

Tablo 3. Towbin Transfer Tamponu.

3. 2 adet filtre kağıdı en altaki kısma yerleştirilir ve üzerine de membran yerleştirilir.
4. Membran üzerine jel konulduktan sonra iki filtre kağıdı membran üzerine konulur.
5. Membran ve filtre kağıdı arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir.
6. Bu işlemlerin ardından kapaklar kapatılır ve 15 Volt gerilim altında 50 dakika transfer yapılır.

G. Bloklama

1. Transferin ardından membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozu (%0.1'lik Tween 20 içeren PBS ile hazırlanır) yani bloklama çözeltisi içinde ve çalkalayıcı üzerinde tutulur.
2. Ardından membran 3 kez bloklama çözeltisi ile 10 dakika süre ile çalkalayıcı üzerinde yıkanır.

H. Birincil antikor ile inkübasyon

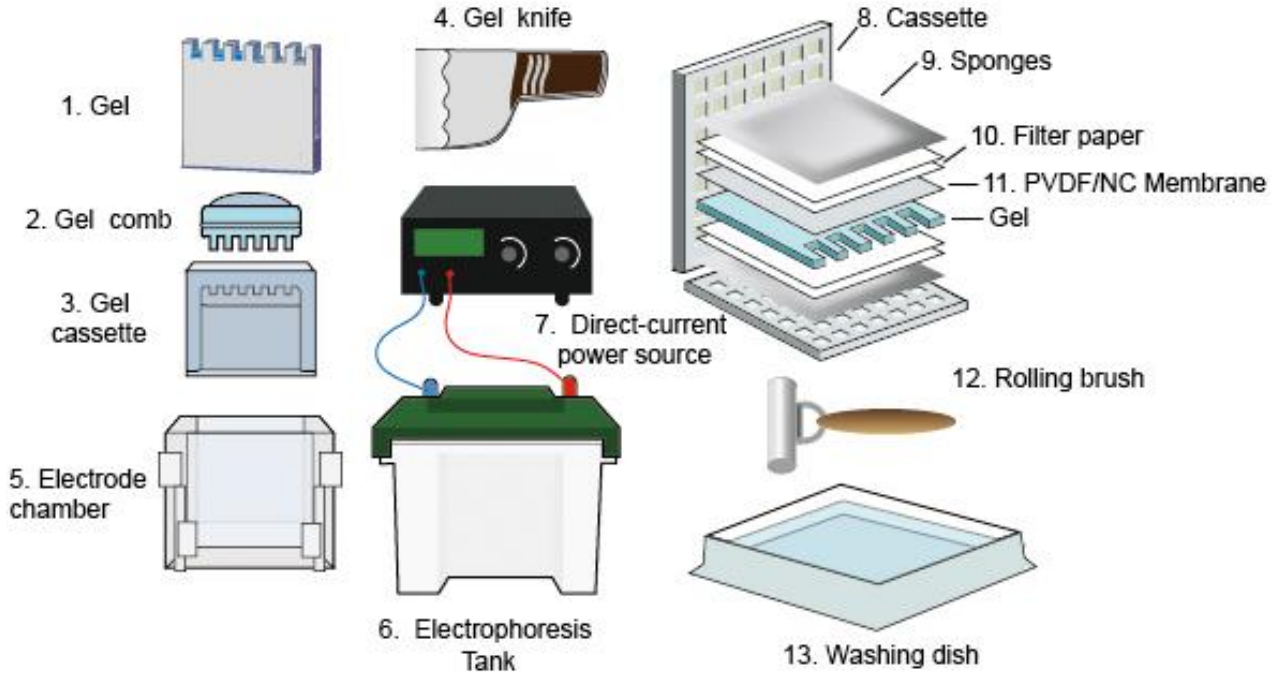
1. Birincil antikor önerilen dilisyonunda, membranın içinde olduğu çözeltiliye eklenir ve 4-48 saat (süre her antikor için farklıdır) +4 °C de yine çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir.
2. Ardından membran 3 kez bloklama çözeltisi ile 10 dakika süre ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında yıkanır.

İ. İkincil antikor ile inkübasyon

1. İşaretlenmiş ikincil antikor bloklama çözelti içinde bulunan membrana eklenir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
2. Bu aşamanın ardından membran 3 kez bloklama çözeltisi ile 10 dakika süre ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında yıkanır.

J. ECL (enhanced chemiluminescent) ile görüntüleme

Horseradish peroksidaz enzimi ikincil antikora bağlıdır ve ECL çözeltisi içinde olan lumigen PS-3 substratını katalizler. Katalizlenen reaksiyonun sonucunda luminol açığa çıkar ve bu da ışımaya yol açar. Açığa çıkan ışımaya, özel filmler ile saptanır (49,50).



Şekil 11. Western blot tekniğinde kullanılan aparatlar (51).

Kalpeptin ile 100 μ M'lik bir dozda muamele edilen hücrelerde FLNA'nın bölünmesi sonucu oluşan FLNA^{CT}'ın üretiminin değişip değişmeyeceğini belirlemek amacıyla, A7 insan melanoma, PC3 insan prostat kanseri, T241 fare fibrosarkoma ve MS1 fare endotel hücrelerinden elde edilen protein lizatlarına western blot uyguladık. Kontrol grupları 100 μ M DMSO ile muamele edildi. Anti-aktin antikorumları imünoblotlarda, yükleme kontrolleri olarak kullanıldı ve bantların dansitometrik okumalarının kantitasyonundan sonra FLNA^{CT} / ACTIN, p-FLNA / t-FLNA, p-ERK1/2 / t-ERK1/2 ve p-AKT / t-AKT oranları hesaplandı. Çünkü bu proteinlerin toplam miktarları ve fosfatlanmış hallerinin, hücre içi sinyal iletiminde, hücrel proliferasyon, farklılaşma ve hücrenin sağ kalımında çok önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Total FLNA (t-FLNA), FLNA^{CT} ve fosfo FLNA (p-FLNA) *Bethyl Laboratories*'den, Aktin *Sigma Aldrich*'den sağlandı. Fosfo ERK 1/2 (p-ERK1/2), total ERK1/2 (t-ERK1/2), fosfo AKT (p-AKT) ve total AKT (t-AKT) antikorumları ise *Cell Signaling Technology*'den sağlanarak immünoblotlama için kullanıldı.

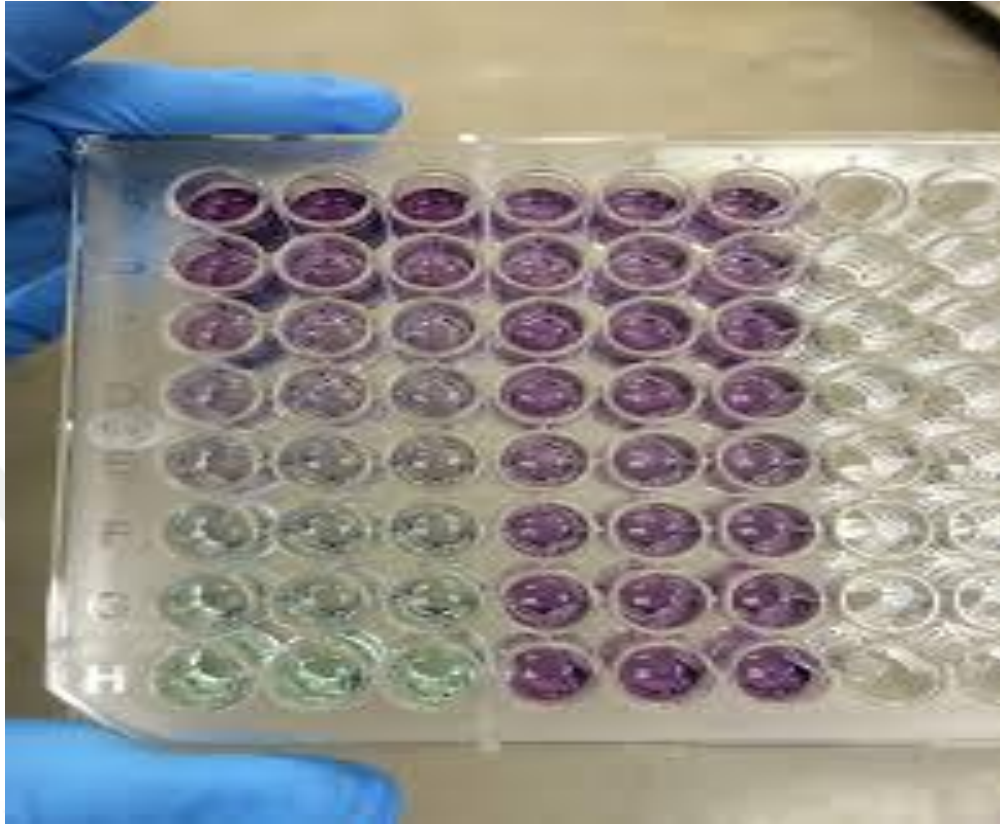
3.6.5. Protein Tayini

3.6.4'de anlatıldığı şekilde elde edilen hücrelerin süpernatantında bulunan proteinlerin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, bisinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu protein değerleri, western blotlamada, kuyucuklara yüklenecek olan protein miktarının bilinmesi açısından önemli ve gereklidir.

Yöntemin İlkesi: Alkali koşullarda proteinler, reaktif içindeki Cu^{2+} iyonlarını Cu^{1+} iyonlarına indirgerler ve bu durum BCA reaktifinde renk değişimi ile gözlenir.

Protein Tayini uygulama basamakları:

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) ve kör olarak distile H_2O kullanıldı.
2. İlk olarak farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 $\mu\text{g/mL}$) BSA standartları hazırlandı.
3. BCA (A) reaktifi (bisinkoninik asit içeren) ve % 4 BCA (B) reaktifi (içinde bakır sülfat içeren) 50:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
4. Standart ve örneklerden 25'er μL 'lik miktarlar 96 kuyucuklu bir mikroplağa konuldu.
5. Standart ve örneklerin üzerine 200 μL 3. aşamada hazırlanan BCA (A) ve (B) karışımından eklendi.
6. 37°C 'de 30 dakika inkübasyon yapıldı.
7. Plak okuyucuda 562 nm'de standart ve örneklerin absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans değerlerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve örneklerin total protein konsantrasyonu bu standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı (52).



Şekil 12. BCA protein tayini.

3.6.6. Migrasyon ve İnvazyon Deneylei

Migrasyon ve invazyon, canlı hücrelerin önemli bir özelliğidir ve normal gelişim, bağışıklık yanıtı ve kanser metastazı ve inflamasyon gibi hastalık süreçleri için kritik önem taşır. Hücre migrasyon ve invazyon inceleme yöntemleri, kanser biyolojisi, immünoloji, vasküler biyoloji, hücre biyolojisi ve gelişim biyolojisi gibi geniş biyomedikal araştırmalar için çok yararlı ve önemlidir.

Transwell hücre göçü ve invazyon testi, hücre motilitesinin ve invazivliğinin bir kemo çekici gradyana karşı kapasitesini ölçer. Böylece hücrelerin migrasyon ve invazyon güçleri hakkında bilgi sağlanmış olur. Bu bilgi, kanser hücrelerinin davranışlarını anlamak açısından çok önemlidir (53). Hücre invazyonu, hücre migrasyonuna benzer. Aralarındaki en önemli fark,

invaze olan hücreler bir bazal membrandan veya ekstra sellüler matriksten geçerek göç ederler. Migrasyon ve invazyonun bilinmesi, tümör hücrelerinin metastaz süreçleri hakkında önemli bilgiler elde etmemizi sağlar (54).

Yöntemin Uygulaması:

Bu analizler için transwell sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde, alt haznede yüksek serumlu ortam bulunduğundan üst kuyuya (transwell) ekilen ve serumsuz ortamda büyütülen hücreler, delikli yapıdan aşağıya inebilirler. Delikli yapının üzerine matrijel (hücre dışı matriks benzeri) bulunduğu ve hücreler alt hazneye geçtiklerinde invazyon özellikleri, matrijel olmadan hareket ettiklerinde ise migrasyon özellikleri test edilmiş olur (*BD Biosciences*). Matrijel (*BD Biosciences*) zemin membranı olarak kullanılmaktadır ve Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarkomadan üretilmiştir. Matrijel, hem zemin bileşenlerini (kolajenler, laminin ve proteoglikanlar), hem de matriks parçalayıcı enzimler ve bu enzimlerin inhibitörlerini, ek olarak da büyüme faktörlerini içerir.

Hücreler, tripsin EDTA ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra, %1 FBS içeren kültür ortamı içinde 5×10^5 hücre/mL yoğunluklu olacak şekilde hazırlanmıştır. Transwell plağın (*Costar, SIGMA*) üst bölmesine 100 μ L hücre süspansiyonu, plakanın alt bölmesine ise %10 FBS içeren tüm besiyerinden 600 μ L eklenmiştir. Hücreler, 37°C sıcaklıktaki CO₂ inkübatöründe 16 saat inkübe edildikten sonra 24-kuyucuklu plaktan transweller çıkartılarak, üst yüzeydeki göç etmemiş hücreler kazınmıştır. Ardından transweller *Giemsa* solüsyonu ile boyanarak, göç etmiş olan hücreler ışık mikroskobu altında sayılmıştır. İnvazyon deneyleri için ise aynı sistem matrijel dökülüp (delikli membranın üzerine), bir gece boyunca donmasını bekledikten sonra yukarıdaki işlem basamakları tekrarlanmıştır. Migrasyon ve invazyon işlemleri aşağıda özetlenmiştir:

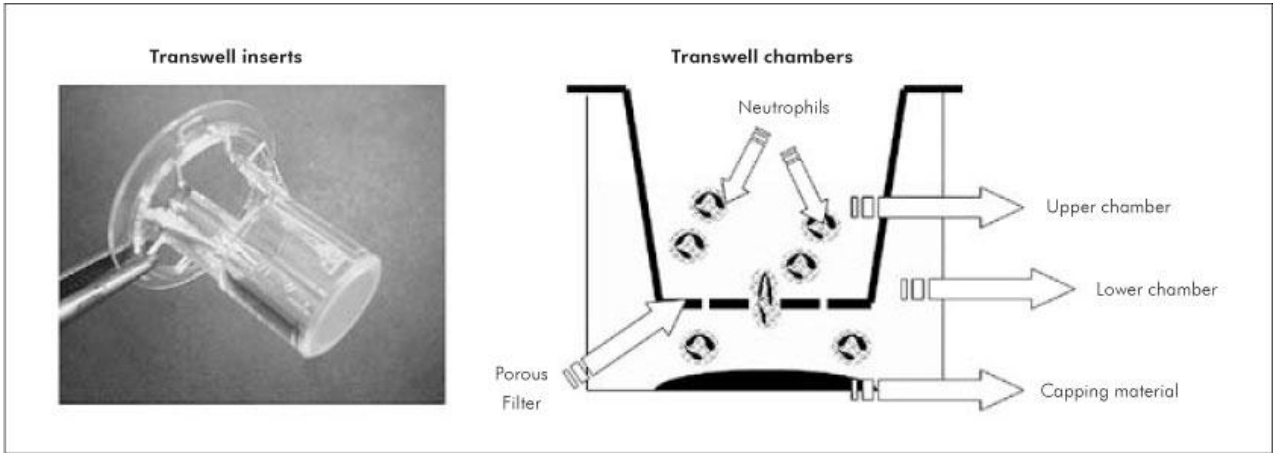
Migrasyon işlem sırası

1. Membran çemberlerin 24 kuyucuklu plakae yerleştirilmesi
2. $2,5 \times 10^5$ hücre, 300 μ L serum içermeyen medium ile çemberin içine eklenmesi
3. 750 μ L serumlu ortamın alt çemberin altına eklenmesi
4. 37 °C de 12-16 saat inkübasyon

5. Mediumun uzaklaştırılması ve 2 x PBS ile yıkama
6. 2 saat oda sıcaklığında formaldehit ile fiksasyon
7. Formaldehiti uzaklaştırmak ve 2x PBS ile yıkamak
8. 20 dakika oda sıcaklığında %100 metanol ile hücrelerin permeabilizasyonu
9. Metanolün uzaklaştırılması ve 2x PBS ile yıkamak
10. Giemsa ile boyamak ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletmek
11. Giemsa'nın uzaklaştırılması ve 2x PBS ile yıkamak
12. Çemberin iç kısmından göç etmemiş olan hücreleri uzaklaştırmak ve dış kısmında kalan hücreleri ışık mikroskobu altında saymak.

İnvazyon işlem sırası:

1. Membran çemberlerin 24 kuyucuklu plaka yerleştirilmesi
2. 100 µL matrigel serum içermeyen ortamda çember içine eklenmesi ve gece boyu 37⁰ C de inkübasyonda tutulması.
3. Migrasyon işlemi sırasındaki 2. aşamadan sonra uygulanan basamakların aynısı tekrarlanır.

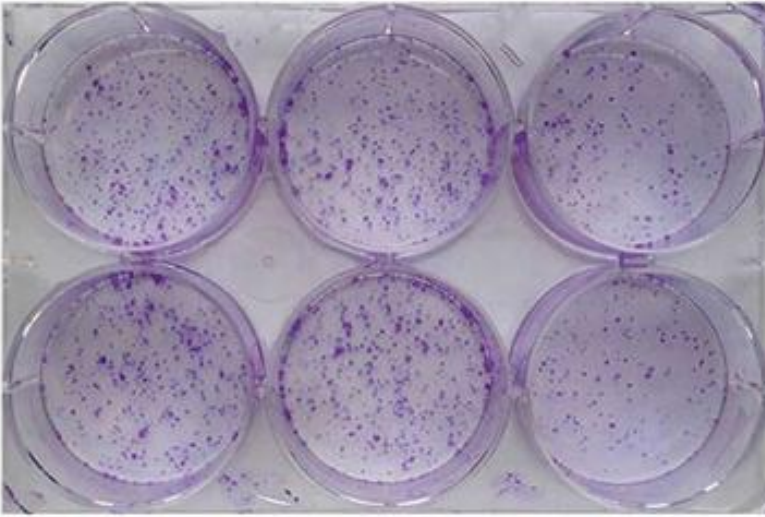


Şekil 13. Migrasyon ve invazyon deneylerinde kullanılan transwell aparatları (55).

3.6.7. Koloni Oluşturma Deneyleri

Yöntemin İlkesi: Klonojenik test veya koloni oluşum testi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüme yeteneğine dayanan, *in vitro* hücre sağkalım testidir. Koloni, en az 50 hücre içeren hücre topluluğu olarak tanımlanır. Test, esas olarak, "sınırsız" bölünme kabiliyetine sahip olması nedeniyle popülasyondaki her hücrenin koloni oluşumunu saptar. Hücrelerin yalnızca bir kısmı koloni üretme kapasitesini korur. Farklı ilaçların/kimyasal ajanların kullanılmasından önce ve sonra, hücreler uygun dilüsyonlarla ekilir ve 1-3 haftalık bir süre içindeki koloni oluşturma süreçleri gözlenir (56).

Yöntemin aşamaları: Hücreler, 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğunda 1000 hücre olacak şekilde hazırlandı. Sigma protokolüne uygun olacak şekilde; üst agar %4 ve alt agar %6 içeren PBS ile hazırlanıp, hücreler üstteki agarda yer alacak şekilde konuldu. Agar donduktan sonra 500 µL medium eklenip, 4 hafta boyunca 37 °C sıcaklıkdaki inkübatörde bekletildi. Üst medium her hafta yenilendi ve dördüncü haftada hücreler, ışık mikroskobu altında koloni olarak incelenip sayıldı.

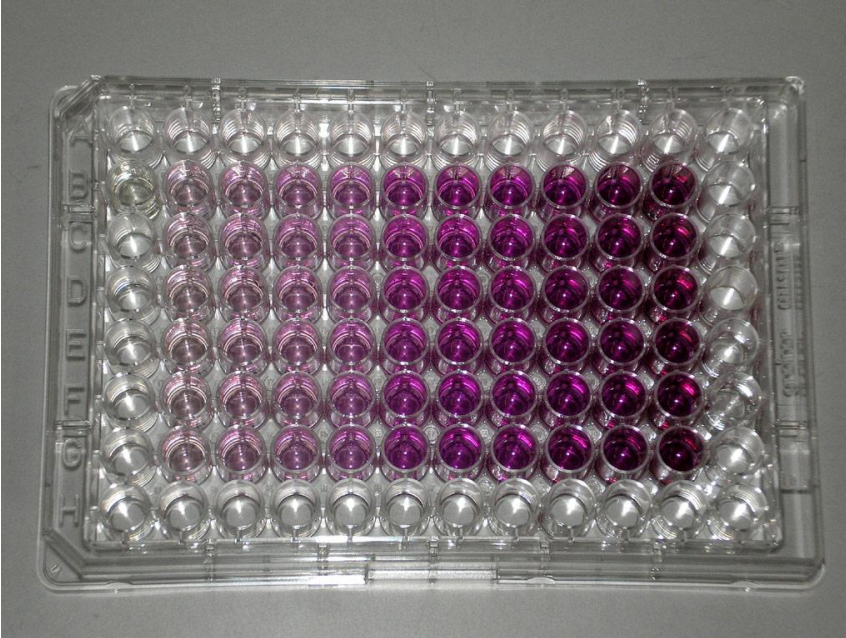


Şekil 14. Koloni Oluşturma.

3.6.8. Hücre Proliferasyon DeneYleri (MTT)

Yöntemin İlkesi: MTT yöntemi, sağlam hücre mitokondrilerinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır (57).

Hücre proliferasyon analizi, MTT Cell Proliferation Assay Kit (*Life Sciences*) protokollerine uygun olarak standart 96 kuyulu plaklarda yapıldı. 100 µL, 50×10^3 hücre, %10 serumlu ortamda 3 tekrar ile 96-kuyucuklu plakta gece boyu inkübe edildi. Sonraki gün ortamı değiştirildi ve 15 µL boya solüsyonu her kuyuya eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyuya 100 µL solubilizasyon/stop çözeltisi eklendi ve gece boyu inkübasyon yapıldı. Bu işlemlerin ardından 96-well plak okuyucuda 570 nm absorbans değerinde, Promega MTT (*CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*) protokolüne uygun olarak okundu.



Şekil 15. MTT testi.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez çalışması için yapılan araştırma planı aşağıdaki şekilde tablolaştırılmıştır. Tez projesi ile ilgili literatür çalışması 2014 yılı süresince yapılmış olup, malzeme alımı ve deneysel çalışmalar 2015 – 2017 yılları aralığında tamamlanmıştır.

Tablo 4. Araştırma planı

İP Adı/Tanımı	2015												2016												2017															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
Protokol Oluşturma ve Malzeme Alımı	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																												
Hücre Kültürü Deneyleri ve Ön Denemeler											x	x	x	x	x																									
Western Blot Deneyleri																x	x	x	x	x	x																			
Hücre Kültürü ve MTT Analizi																					x	x	x	x	x															
Hücre Kültürü ve Koloni Oluşturma Deneyleri																									x	x	x	x	x	x										
Migrasyon ve İnvazyon Deneyleri																																			x	x	x	x	x	x
Çalışmaların Toplanması ve İstatistiksel Analiz																																					x	x	x	
Deney Verilerinin Değerlendirilmesi ve Tezin Yazılması																																						x	x	

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında non parametrik testler (Unpaired two-tailed Student t testi) ile GraphPad Prism 6 programını kullanarak değerlendirildi. Veriler ortalama \pm standart sapma biçiminde gösterildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda bütçe ve zaman sınırlaması söz konusu olmuştur. Bütçemiz ve daha fazla zamanımız olsaydı, deneyler daha farklı hücre hatlarında yapılabilirdi. Ayrıca deney hayvanları ile çalışmak ve kanser hastalarından alınacak örnekler üzerinde çalışmak da bu konuda çok değerli bilgiler elde etmemizi sağladı. Böylece bizim çalışmış olduğumuz farklı hücre hatlarından elde edilen bu çok değerli bulgular, deney hayvanı ve insandan elde edilecek bulgular ile karşılaştırılarak, kanser tedavilerine ilişkin daha kapsamlı ve yeni bilgilerin ortaya çıkmasına aracı olabilirdi. Eğer bir canlıdan alınan hücreler kullanılsaydı, sonuçları etkileyecek başka parametreler ve bunların varlığında ortaya çıkan interferanslar için farklı değerlendirmeler yapılabilirdi. Ayrıca, kalpeptin dışında, daha farklı kalpain inhibitörleri de kullanılabilir, bu inhibitörler karşılaştırılabilir ve kalpain için en uygun olan inhibitör derecelendirmesi yapılabilirdi.

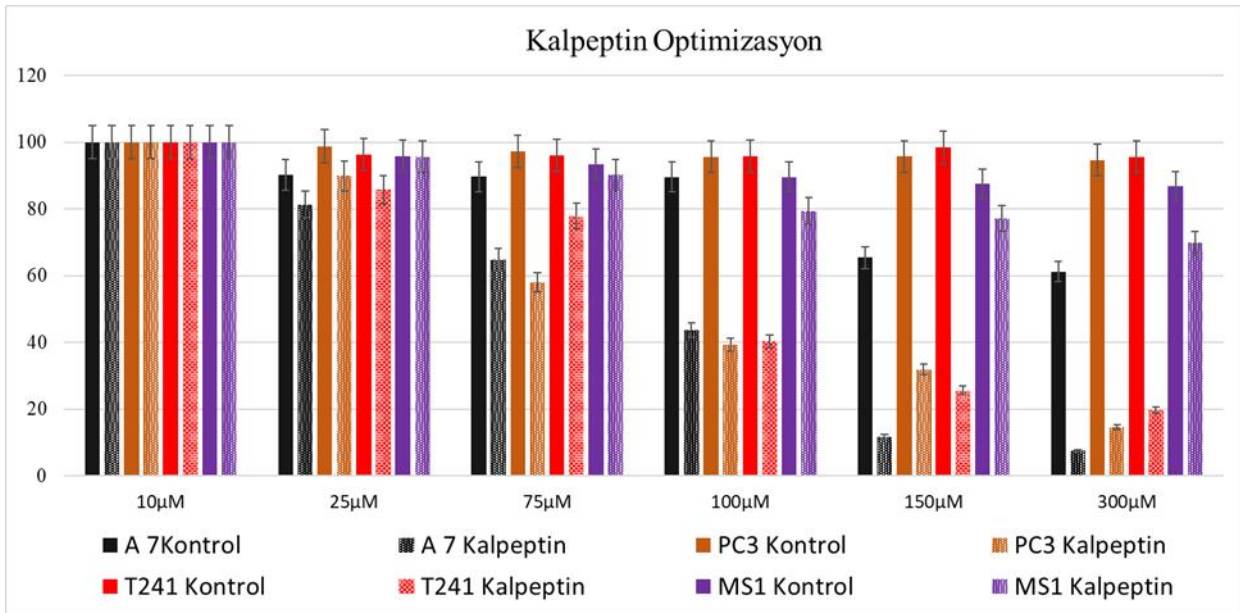
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışmanın deneysel bölümü Götting Üniversitesi'nde yapılmıştır. Götting Üniversitesi'nde hücre kültürü çalışmaları için etik kurul onayı gerekmemektedir.

4. BULGULAR

4.1. Kalpeptin Optimizasyon Deneyleleri

Kalpeptin her hücre hattı için farklı konsantrasyonlarda etkili olabilir. IC₅₀ (half-maximal (50%) inhibitory concentration) deneyi için bölüm 3.6.8 de açıkladığımız şekilde MTT yapıldı. Tüm hücre hatlarında kalpeptinin IC₅₀ konsantrasyonunu belirlemek için 6 farklı konsantrasyonda (10, 25, 75, 100, 150, 300 µM) kalpeptin denendi. Kontrol gruplarında ise sırasıyla (10, 25, 75, 100, 150 300µL) DMSO eklendi. Sonuç olarak 100 µM kalpeptin tüm hücre hatlarında IC₅₀ konsantrasyonu olarak belirlendi ve tüm deney gruplarında 100 µM kalpeptin kullanıldı. MS1 hücre hattı diğer hücrelerden (A7,PC3, T241) farklı olarak malign hücre olmadığından, kalpeptinin kullanıldığı tüm dozlarda IC₅₀ değeri elde edilemedi. Bu farklı dozlar arasında kontrol ile MS1 hücresi arasında çok fark bulunmadığı için, MS1 hücresi için de diğer hücreler gibi 100 µM kalpeptin konsantrasyonu kullanıldı. Veriler ortalama ± SD değerleri olarak gösterildi, n = 3 tekrar yapıldı.

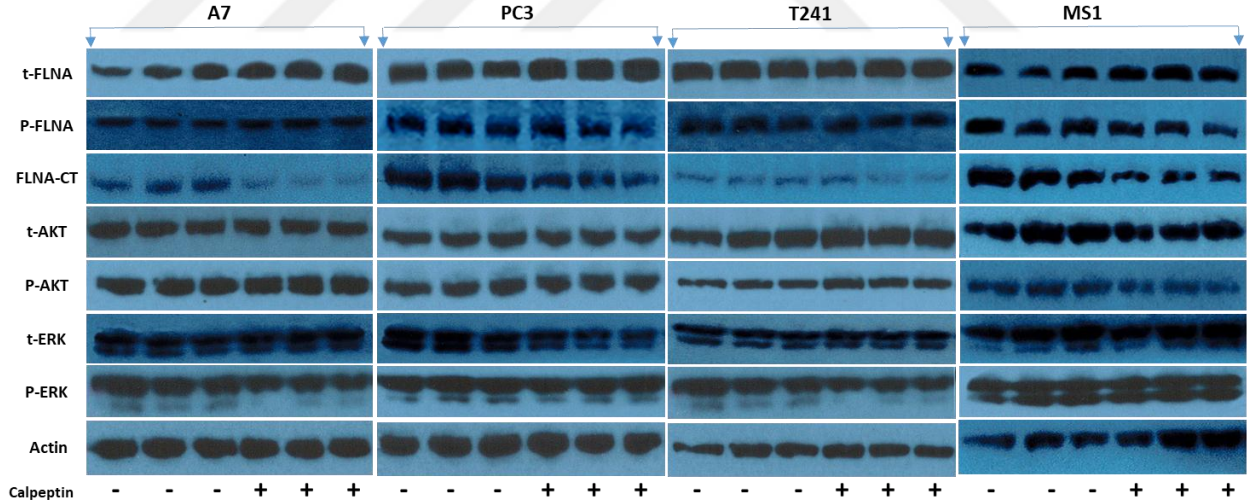


Şelik 16. Kalpeptin Optimizasyon Deneyleleri

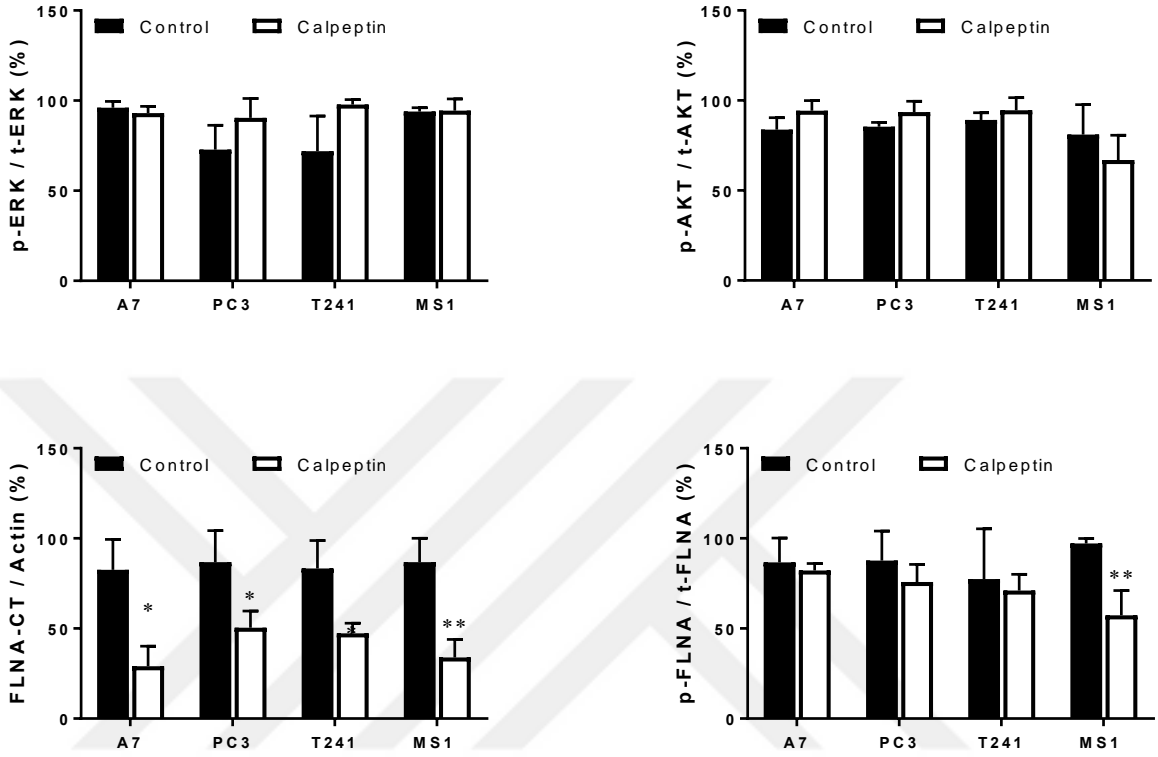
4.2. Kalpeptin'le Etkileştirilen Hücrelerde FLNA^{CT} İfadesi

Kalpeptinin FLNA bölünmesi üzerindeki rolünü incelemek için dört farklı hücre, T241, PC3, A7 ve MS1 kullanıldı. FLNA ve FLNA^{CT}'nin görelî düzeylerinin kalpeptin tarafından etkilenip etkilenmediğini belirlemek için, kalpeptin (100 µM) ile muamele edilen gruplarda ve kontrol gruplarında (100 µM DMSO) western blot analizi uygulandı. Kalpeptin ile tedavi edilen gruplarda FLNA^{CT} düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi. Kalpeptin ile muamele edildikten sonra, FLNA^{CT}'nin ekspresyon düzeyleri; A7 hücrelerinde % 66,6 (P <0,05), PC3 hücrelerinde % 41,9 (P <0,05), T241 hücrelerinde % 43,3 (P <0,05) ve MS1 hücrelerinde %60,9 (P <0,01) oranında azaldı.

Westernblot denemelerinde, p-ERK1/2 / t-ERK1/2, p-FLNA, t-FLNA, p-AKT/t-AKT antikoları kullanılmış ve ekspresyon düzeyinde, kontrol grubu ile kalpeptin eklenmiş olan grupların arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 17).



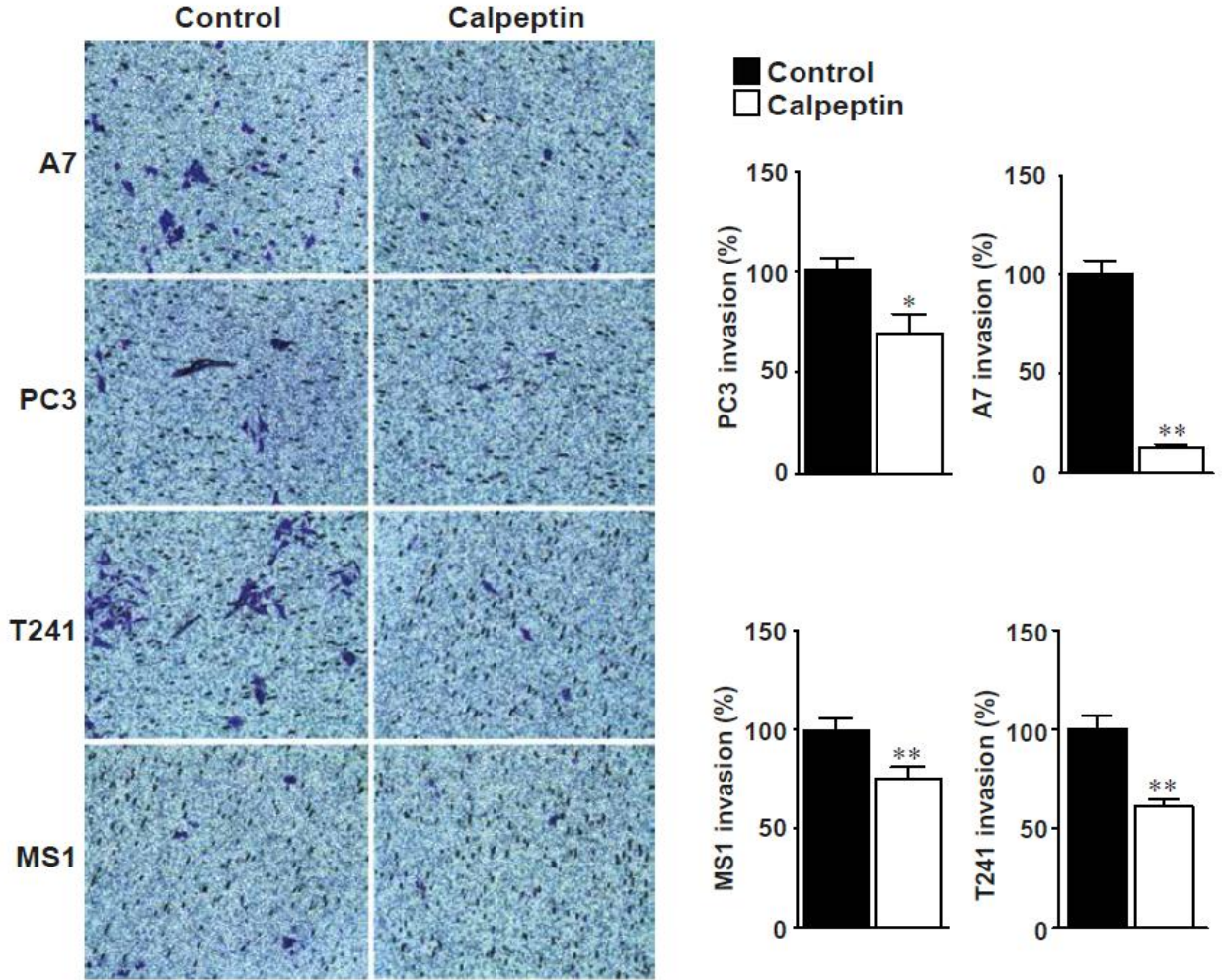
*Kalpetin (-) kontrol gruplarını, kalpetin (+) deney gruplarını göstermektedir.



Şekil 17. Kontrol ve kalpeptin ile etkileştirilmiş hücrelerde (T241, PC3, A7 ve MS1), p-ERK1/2, t-ERK1/2, p-FLNA, t-FLNA, FLNA^{CT}/Aktin, p-AKT, t-AKT ve aktin westernblot analiz sonuçları. Kalpeptin (100 µM) ile muamele edilmiş hücreler (T241, PC3, A7, MS1) daha az FLNA^{CT} üretir. Veriler ortalama ± SD değerleri olarak gösterilmiş, n = 3 olarak alınmıştır. Unpaired two-tailed Student t testi kullanıldı, * P < 0.05 ve ** P < 0.01.

4.3. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde İnvazyon

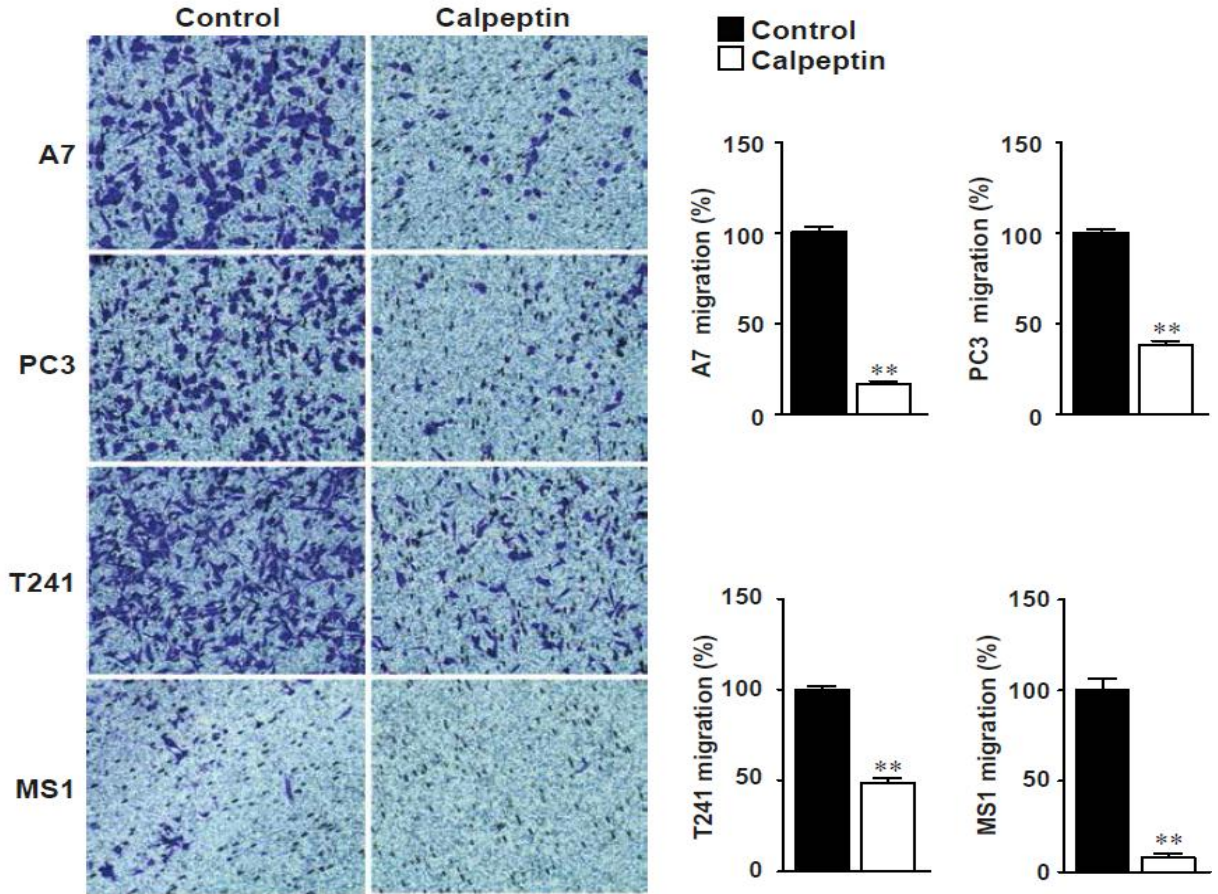
Kalpeptinin hücre invazyon üzerindeki etkisini araştırmak için, yukarıda tarif edildiği gibi T241, PC3, A7 ve MS1 hücrelerinde, yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde invazyon kiti (*SIGMA, Costar*) kullanıldı. Kalpeptin grupları 100 µM kalpeptin, kontrol grupları ise 100 µM DMSO ile muamele edildi. Kalpeptinin varlığında hücre invazyonunun, kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğu saptandı. Hücrelerin kalpeptin ile muamele edilmesi sonucunda, kontrol gruplarına kıyasla hücre invazyonunun, A7 hücrelerinde %86,2 (P <0,01), PC3 hücrelerinde % 29,8 (P <0,05), T241 hücrelerinde % 38,2 (P <0,01) ve MS1 hücrelerinde ise % 24,3 (P <0,01) oranında azalmış olduğu saptandı (Şekil 18).



Şekil 18. Kalpainin kalpeptin tarafından inhibe edilmesi, hücresel invazyonu azaltır. T241, PC3, A7 ve MS1 hücre hatları, 16 saatlik inkübasyonun ardından kontrollere (100 μ M DMSO) kıyasla daha az invaziv olmuşlardır. Veriler ortalama \pm SD değerleri olarak gösterilmiştir ve n = 3'tür. Unpaired two-tailed Student t testi kullanılmış ve * P < 0.05 ve ** P < 0.01 bulunmuştur.

4.4. Kalpeptin ile Etkileştirilen Hücrelerde Migrasyon

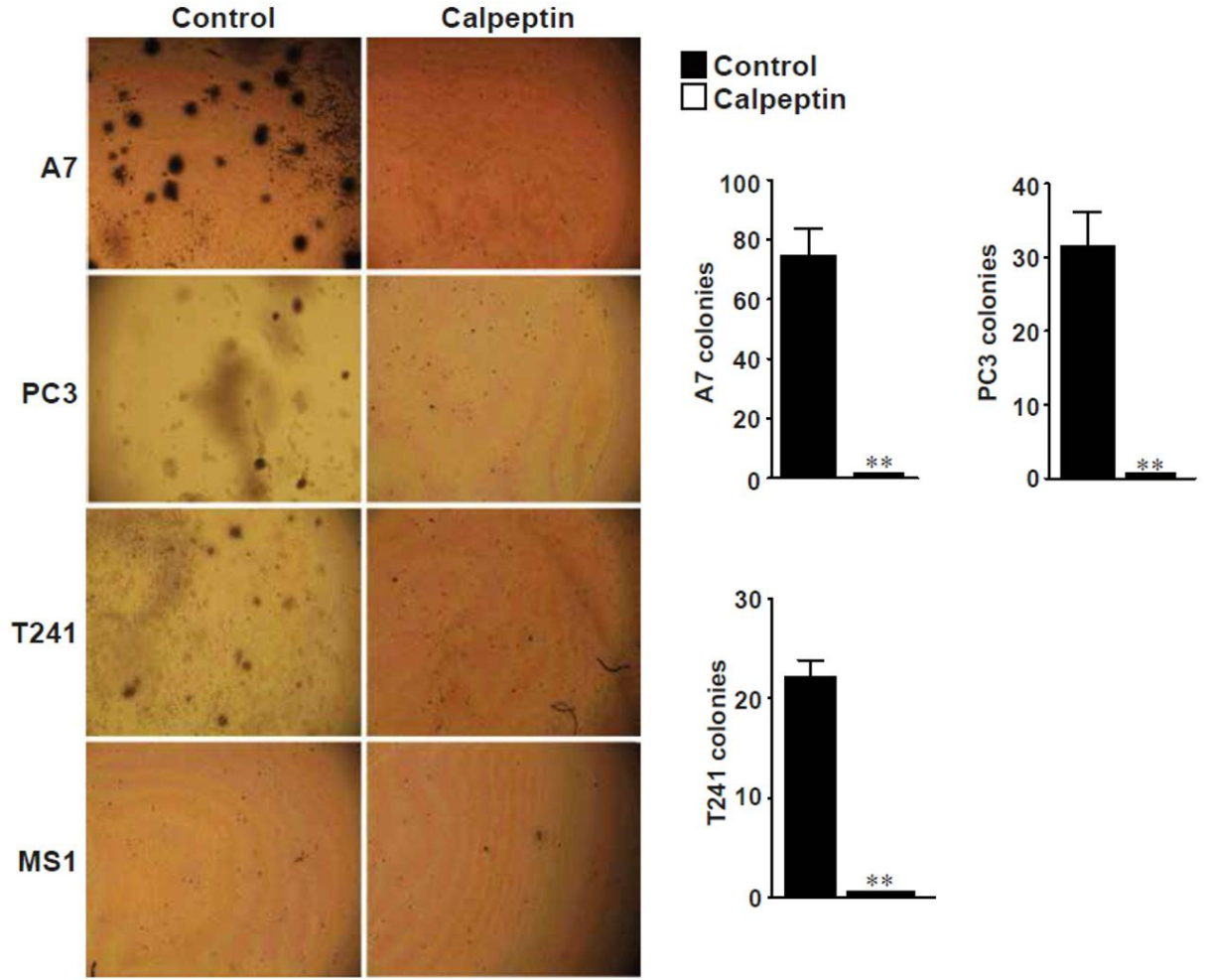
Kalpeptinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için, yukarıda tarif edildiği gibi T241, PC3, A7 ve MS1 hücrelerinde migrasyon kiti (*SIGMA*) ile denemeler yapıldı. Kalpeptin grupları 100 μ M kalpeptin, kontrol grupları ise 100 μ M DMSO ile muamele edildi. Kalpeptinin varlığında hücre migrasyonunun, kontrollere kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğu saptandı. Hücrelerin kalpeptin ile muamele edilmesi sonucunda hücresel migrasyonun, kontrol gruplarına kıyasla, A7 hücrelerinde % 82,1 ($P < 0,01$), PC3 hücrelerinde % 60,8 ($P < 0,01$), T241 hücrelerinde % 50,5 ($P < 0,01$) ve MS1 hücrelerinde ise % 91,3 ($P < 0,01$) oranında azalmış olduğu gözlemlendi (Şekil 19).



Şekil 19. Kalpainin kalpeptin tarafından engellenmesi, hücresel migrasyonu azaltmaktadır. T241, PC3, A7 ve MS1 hücre hatları, 16 saatlik inkübasyonun ardından kontrollere (100 μ M DMSO) kıyasla daha az göç etmiştir. Veriler ortalama \pm SD değerleri olarak gösterilmiştir ve $n = 3$ 'tür. Unpaired two-tailed Student t testi kullanılmış, * $P < 0,05$ ve ** $P < 0,01$ olarak bulunmuştur.

4.5. Kalpeptinin İnhibisyonu Hücrelerin Koloni Oluşumunu Azaltır

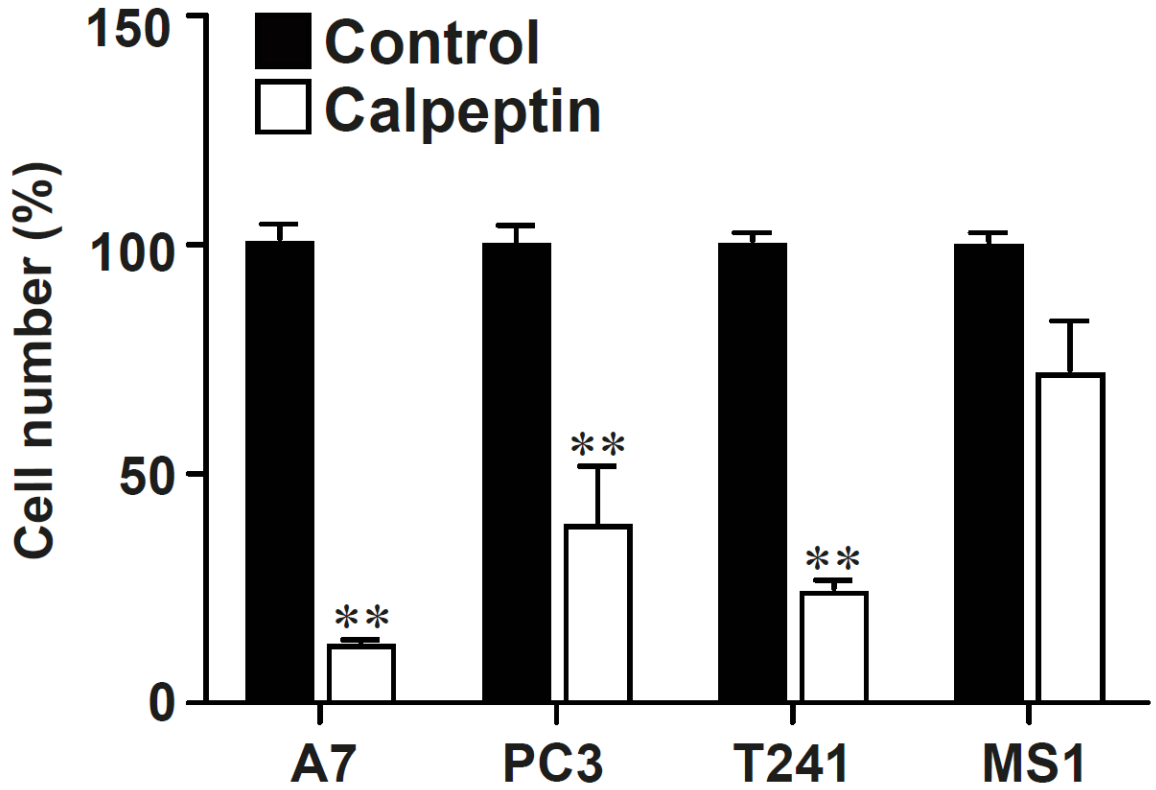
Kalpeptinin (FLNA bölünmesini engellemesine bağlı olarak), hücrenin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisini araştırmak için yine T241, PC3, A7 ve MS1 hücreleri kullanıldı. Kalpeptinle muamele edilen gruplara 100 μ M kalpeptin ve kontrol gruplarına 100 μ M DMSO eklendi. Dört hafta sonra MS1 hücrelerinin, hem kalpeptin ile etkileştirilen hücrelerinde hem de kontrol gruplarında herhangi bir koloni oluşumu gözlenmedi. Oysaki T241, PC3 ve A7 hücrelerinin kontrol gruplarında büyük kolonilerin oluşumu gözlenmiştir. Ancak bu hücrelerin kalpeptinle etkileştirildikten dört hafta sonra yapılan incelemelerinde, hiçbirinde koloni oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Kalpainin kalpeptin ile inhibe edilmesi, hücrelerin koloni oluşumunu azaltır. T241, PC3 ve A7 hücrelerinin, kalpeptinle (100 μ M) etkileştirilmesinden dört hafta sonra, koloni oluşturmadıkları görülmektedir. Veriler ortalama \pm SD değerleri olarak gösterilmiştir, n = 3'tür. Unpaired two-tailed Student t testi kullanıldı, ** P < 0.01.

4.6. Kalpeptin'le Etkileştirilmiş Hücrelerde Gözlemlenen Hücre Proliferasyonu

FLNA^{CT}'nin hücre proliferasyonu üzerindeki rolünü incelemek için yine dört farklı hücre türü, T241, PC3, A7 ve MS1 kullanıldı. Tedavi edilen gruplara 100 µM kalpeptin ve kontrol gruplarına 100 µM DMSO ilave edildi. Kontrollere kıyasla, kalpeptin ile tedavi edilen gruplarda hücre proliferasyonu düzeylerinde anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. Hücrelerin kalpeptin ile muamele edilmesi sonucunda, proliferasyon düzeyi, A7 hücrelerinde %86,5 (P <0,01), PC3 hücrelerinde %60,4 (P <0,01), T241 hücrelerinde %74,1 (P <0,01) oranında azalmaktadır. MS1 hücrelerinin proliferasyonunda %37,4 (P > 0,05) oranındaki azalma anlamlı değildir (Şekil 21).



Şekil 21. Kalpainin, kalpeptin tarafından inhibe edilmesi hücresel proliferasyonu etkiler. Kalpeptin (100 µM) ile muamele edilen T241, PC3 ve A7 hücreleri, kontrollere (100 µM DMSO) göre daha az proliferere olmuştur. Veriler ortalama ± SD değerleri olarak gösterildi, n = 3. Unpaired two-tailed Student t testi kullanıldı, * P <0.05 ve ** P < 0.01.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, FLNA'nın, kalpain tarafından proteolizi, ve proteoliz sonucu üretilen, 90 kDa'lık FLNA^{CT} fragmentinin, ele aldığımız farklı kanser hücrelerinin, proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturmalarında önemli bir rol oynadığını saptadık. Hücrelerin kalpeptin ile muamele edilmesi sonucunda, kalpeptinin, kalpaini inhibe ederek FLNA'nın kesilmesini engellendiğini ve dolayısıyla da FLNA^{CT} üretimini azalttığını gösterdik ve literatüre yeni bir bilgi kazandırdık. Bu inhibe edici etkilerin seviyesi, kanserli ve kanserli olmayan hücreler arasında farklıydı.

Son yıllarda kalpainleri hedef alan tedavi stratejilerine yönelik çalışmaların sayılarında artış vardır. Elde edilen son veriler, kalpain aktivitesinin spesifik inhibitörlerle bloke edilmesinin, primer tümörlerin gelişimini ve metastazların oluşumunu sınırlamak için yeni bir yaklaşım olduğu görüşündedir. Bu durum, kanser hücresinin migrasyonunu ve invazyonunu baskılayarak ortaya çıkar. Hücresel migrasyon ve invazyon, kanser hücresinin büyümesine ve yayılmasına sebep olan neo vaskülarizasyonundan sorumludur (24). Bütün bu nedenlerden dolayı, kalpainler, potansiyel anti-kanser hedefleri olarak birçok araştırmacı tarafından ele alınmaktadır. Kalpain sistemini bloke etmenin olumlu etki ve sonuçları, meme (58), kolon (59), pleural mesothelioma (60), pankreas (45) ve prostat (61) kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok insan kanser hücre çalışmasında bildirilmiştir. Buna ek olarak yine birçok insan kanser hücresi ile yapılan çalışmada, kalpainlerin anormal bir şekilde eksprese oldukları gösterilmiştir (62). Kalpain substratları yani kalpainle etkileşime girebilen moleküller; hücre iskeleti ve ilişkili proteinleri, kinazları ve fosfatazları, zar reseptörlerini ve taşıyıcıları, steroid reseptörlerini içerir (62). Bizim de incelediğimiz insan kanser hücrelerindeki bulgularımız da literatürle uyumlu olarak, FLNA'nın bir kalpain substratı olduğunu gösterdi. Ayrıca ve yeni bir bilgi olarak, FLNA'nın kesilmesinin, çalışmamızda kullandığımız kanser hücrelerinin davranışına aracılık ettiğine dair kanıtlar elde etmemizi sağladı.

Fare embriyonik fibroblast (1) ve endotel hücrelerinde (3) yapılan çalışmalarda, FLNA kaybının hücresel göçü bozduğu gösterilmiştir. Hücresel migrasyon, embriyogenez sırasında organları yeniden yapılandırmak ve ayrıca fizyolojik uyarılara tepki olarak yeniden üretim yapmak zorunda olan embriyonik hücreler için önemli bir olaydır. Bu hücreler uygun anatomik

bölgelere ulaşamadığında, organ gelişiminde, kardiyovasküler sistemde ve iskelet sisteminde çok ciddi bozukluklar ortaya çıkar (63). İnsanda, *FLNA* genindeki mutasyonlar, erken embriyonik ölüm ve gelişme komplikasyonları ile ilişkilidir (64). Filaminin *FLNA*, *FLNB* ve *FLNC* olmak üzere üç farklı izoformu vardır. Yapısal olarak, *FLNA* ve *FLNB* birbirine benzemektedir, ancak bu izoformlardan birinin yani *FLNA* (63) ya da *FLNB* (65)'den birinin kaybı diğeri ile kompanse edilemez ve sonuç olarak tek bir *FLNA* ya da *FLNB* kaybı embriyonik ölüm ile sonuçlanır. *FLNB* yokluğunda, fare fibroblastlarında (65) *FLNA* ekspresyonunun artmadığı veya *FLNA* yokluğunda da *FLNB*'nin ekspresyonunda bir artış olmadığı gösterilmiştir (63).

FLNA'nın hem normal hem de kanserli hücrelerde çok büyük bir öneme haiz olması nedeniyle, çalışma ekibimizde yer alan L. Akyürek ve arkadaşları tarafından bu konu daha önce ele alınmış ve melanoma kanseri hücrelerinde yapılan *in vivo* çalışmalarında, *FLNA* yokluğu olan hücrelerin daha az göç ettikleri gösterilmişti (12). *FLNA*, gerek sitoplazmada bulunan, hücre içi sinyal yollarını düzenleyen ve gerekse nükleusta bulunan transkripsiyon faktörlerini düzenleyen birçok moleküle etkileşime girmektedir. Bu çalışmalarında, transkripsiyon faktörlerinden biri olan HIF-1 α 'nın tümör hücrelerinde *FLNA*^{CT} ile etkileşimde olduğu ve *FLNA*^{CT}'nin, HIF-1 α 'nın nükleusa taşınmasında aracılık ettiği ve ayrıca nükleus içerisinde transkripsiyonel kompleksin bir parçası haline geldiği bildirilmişti (12). İlginç sonuçlardan biri de, kalpain inhibisyonunun VEGF salınımını azalttığı doğrultusundadır. Böylece *FLNA* ile etkileşime girdiği belirlenen moleküllerin sayısı giderek artmaktadır (4). Bu etkileşime giren moleküller, içinde buldukları hücre türüne ve farklı uyarılara maruz kalan tümör çevresine bağlı olarak farklı seviyelerde eksprese edilirler. Dahası, *FLNA* ekspresyon seviyesi, kanser türüne bağlı olarak da değişebilir (66).

Biz bu çalışmada *FLNA* ile etkileşime giren hücreye özgü moleküllerden olan kalpainin farklı mekanizmalara aracılık eden kanser hücrelerinde sebep olduğu etkileri araştırdık. Daha önce çalışılmamış olan PC3 (insan prostat kanseri), A7 (insan melanoma), T241 (fare fibrosarkoma) ve MS1 (fare endotel) hücrelerini kullandık. Bu hücrelerde *FLNA*'yı keserek, *FLNA*^{CT} oluşumunu arttıran kalpaini bloke etmek amacıyla da hücre membranından kolayca geçebilen, kalpain 1 ve 2'yi spesifik olarak inhibe edebildiği bilinen, diğer kalpain inhibitörlerine göre daha az sayıda başka proteinlerle etkileşen ve çok küçük IC₅₀ (5-8 nM) değerine sahip olduğu bilinen (6,7,46,47,48) kalpeptin'i inhibitör olarak seçtik. Hücrelerimizde, IC₅₀ değerini

100 µM olarak belirlediğimiz kalpeptinin, kalpaini başarılı bir şekilde inhibe ettiğini ve bu inhibisyon mekanizmasının, kanser oluşum sürecindeki etkilerini gösterdik.

Daha önce, Liu T ve arkadaşları, androjen reseptör (AR)-negatif PC3 insan prostat kanser hücrelerinde ve androjen-bağlı prostat kanser hücrelerinde (LNCaP), uzun süreli androjen yoksunluğu oluşturmuşlar ve bu androjen yoksunluğunun kalpain 1'in değil, kalpain 2'nin ve FLNA'nın aşırı ekspresyonuna sebep olduğunu ifade etmişlerdir. Kalpain 2'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak FLNA^{CT} üretiminin de arttığını göstermişler ve kalpeptini, kalpain 2 inhibitörü olarak kullanmışlar ve sonuçta, kalpeptin ve androjen yoksunluğu kombinasyonunu prostat kanseri progresyonunu önlemek veya ertelemek için yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (31).

Kwak ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada kalpeptin, başka inhibitörler ile kıyaslanmıştır. Kalpain inhibitörleri olarak; kalpeptin, Z-Leu-Met-H ve leupeptin'i kullanmışlardır. Bu çalışmalarında Z-Leu-Met-H nin, kalpeptine kıyasla daha yüksek konsantrasyonda kullanılması gerektiğini ve geri dönüşümlü bir inhibitör olduğunu saptamışlardır. Leupeptin'in ise hücre geçirgenliğinin çok az olduğunu ve ayrıca da FLNA'nın kesilmesinin inhibisyonunda başarılı olmadığını rapor etmişlerdir (46). Bir başka çalışmada da yine kalpainin kalpeptin tarafından inhibisyonu ile ilgili sonuçlar, Fujitani ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (47). Kalpeptinin başarılı bir kalpain inhibitörü olarak kullanılabileceği Basse ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Araştırmalarında trombosit hücrelerini kullanmışlar ve bu hücrelerdeki kalpaini, kalpeptinle inhibe ettiklerinde, filaminlerin degradasyonunu da engellemiş olduklarını ifade etmişlerdir (48).

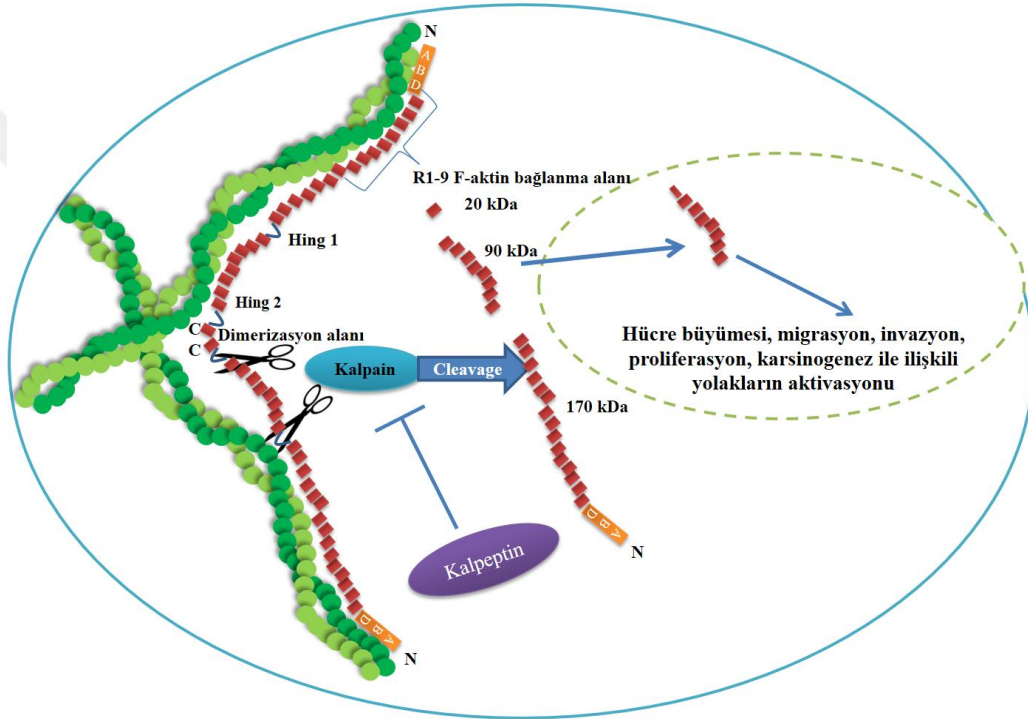
Bu araştırmaların hiçbirinde ve literatürde, FLNA'nın kesilmesi sonucu ortaya çıkan FLNA^{CT} fragmanının kanser süreçleri ile olan ilgisine dair bir bilgi yoktur. Bizim bu konuyu ele almamızın en önemli nedeni, kanser ile ilgili araştırmacılara ışık tutacak yeni bilgilerle literatüre katkı sağlayacağımıza olan inancımızdır.

Kanser hücrelerinin en önemli özellikleri, sürekli bölünme yeteneklerinin olması, aşırı proliferasyon olmaları, kolayca migrasyon ve invazyon yapabilmeleri ve koloni şeklinde büyümeleridir. Bu nedenle çalışmamızda, FLNA^{CT}'nin farklı hücrelerdeki [PC3 (insan prostat kanseri), A7 (insan melanoma), T241 (fare fibrosarkoma) ve MS1 (fare endotel)] proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneğindeki rolünü açıklamaya çalıştık. Kalpain'in,

menteşe-1 ve 2 bölgelerinden FLNA'yı kestigi ve FLNA'nın 90 kDa molekül ağırlığındaki fragmanının yani FLNA^{CT} nin üretimine yol açtığına ilişkin literatürde çok sayıda bilgiler almaktadır. Bizim hücrelerimiz üzerinde yaptığımız western blot deneyleri de FLNA^{CT} üretiminin arttığını göstermiştir. Kalpain'nin kalpeptin tarafından inhibe edilmesi durumunda, FLNA'nın söz konusu menteşe-1 bölgesinden kalpain tarafından kesilmesi azalacak ya da engellenecektir. Nitekim western blot analizinde 90 kDa'da gözlemlenen FLNA^{CT} bandının oluşumunda saptadığımız azalma, bu düşüncemizin doğru olduğu göstermiştir. FLNA^{CT} nin hücre içine transloke olduğu yine birçok çalışmada gösterilmiş (23), ayrıca çalışma ekibimizde yer alan L. Akyürek ve ark. (12) ları tarafından da FLNA^{CT} nin, HIF-1α ile hücre çekirdeğine geçişine ilişkin bir mekanizma (Şekil 1) önerisi olmuştur. Bu nedenle ele aldığımız hücrelerdeki western blot deneylerinde, sinyal ileti yollarında etkin rol oynayan p-ERK1/2 / t-ERK1/2 ve p-AKT/t-AKT oranlarına ve ayrıca, p-FLNA, FLNA ve FLNA^{CT} düzeylerini inceledik. Kalpeptinle tedavi edilmiş hücrelerde FLNA^{CT}ye ait bantlarda azalma olduğunu saptadık. Ancak p-ERK1/2 / t-ERK1/2, p-FLNA, t-FLNA, p-AKT/t-AKT antikoları ile yapılan western blot deneylerinde, kontrol grubu ile kalpeptin eklenmiş olan gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemedik.

Ayrıca, filamin A'nın fosforillenmiş halinin, kanserin gelişim sürecinde belirteç niteliğinde olan hücre proliferasyonu, hücresel migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneğine olan etkisini belirlemek amacıyla, PC3, A7 ve T241 hücrelerinde, p-FLNA (fosforillenmiş FLNA) için immüno blotlama yaptık ve p-FLNA bandının anlamlı olarak değişmediği gözledik. Fakat MS1 hücrelerinin immüno blot analizinde görülen p-FLNA bandında, kalpeptin ile tedavi edilen gruplara göre anlamlı olarak azalma gözlemlendi. MS1 hücrelerinin diğer hücrelerden (PC3, A7 ve T241 kanser hücreleri) farkı, benign fare endotel hücreleri olmasıdır. Fosforillenmenin az olması, daha çok FLNA'nın kesilmeye uğrayacağını ve FLNA^{CT} nin artacağını gösterir. Bu da MS1 hücrelerinde, proliferasyon açısından, kalpeptin ile kontrol grubu arasında anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Ek olarak, FLNA ile ilgili hücre proliferasyonu deneylerinde, FLNA'nın kesilmesinin engellenmesine bağlı olarak FLNA^{CT} nin üretiminde azalma olduğu ve buna bağlı olarak da T241, PC3 ve A7 hücrelerinde proliferasyonun azaldığı görüldü. Bu veriler, kalpeptinin MS1 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediğini fakat FLNA'nın fosforilasyonunu etkilediğini ifade etmektedir. Kalpeptinle etkileştirilen MS1 hücrelerinde, FLNA'nın fosforilasyonu azalmış ve bu sebeple de hücrelerin

proliferasyonunda kontrole kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak, sadece FLNA^{CT}'nin değil FLNA'nın fosforilasyonundaki azalma da hücre proliferasyonunu etkilemektedir. Bununla birlikte, FLNA'nın fosforilasyonunda değişiklik yapılmaksızın, FLNA^{CT}'nin üretiminde bir azalmanın olması da yine hücre proliferasyon seviyesini azaltmıştır. Başka bir deyişle, FLNA'nın fosforilasyon seviyelerindeki artış, kanser hücrelerindeki hücre proliferasyonunu azaltmak için yararlı olabilecek çeşitli mekanizmalardan biri olabilir (şekil 22).



Şekil 22. FLNA'nın kalpain tarafından kesilmesi mekanizmasını göstermek için önerilen şema.

Çalıştığımız bütün hücre hatlarında, yine kalpeptin ile muamele edilen gruplarda, hücrelerin hem migrasyonunda hem de invazyonunda belirgin bir azalma olduğunu saptadık. Migrasyon ve invazyon deneylerinin sonuçları da yine kalpeptinin, kalpain için bir inhibitör olarak kullanılmasının, kanser hücrelerinin göç etmelerini ve yayılmalarını engelleyici bir kimyasal ajan olabileceğini göstermiştir.

Koloni oluşturma ile deneylerimizde de T241, PC3 ve A7 hücrelerinin kontrol gruplarında (100 µM DMSO), büyük koloni oluşumları görülmüş, ancak kalpeptin ilave edilen gruplarda (100 µM kalpeptin) koloni oluşumu gözlenmemiştir. MS1 hücrelerinde ise hem tedavi edilen

grupta hem de kontrol grubunda hiçbir şekilde koloni oluşumu gözlenmedi. Çünkü MS1 hücreleri, yukarıda da belirttiğimiz gibi benign endotel hücreleridir.

Genel olarak, hücre hatlarında yaptığımız *in vitro* deneylerden elde ettiğimiz sonuçlar, kalpeptin ile FLNA'nın bölünmesinin engellenmesinin, kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini de engellediğini göstermiş olup, karsinogenezin baskılanmasında, kalpeptin'in yararlı bir ajan olabileceğini göstermiştir. FLNA'nın, kalpain ile kesimi sonucu meydana gelen FLNA^{CT} nin çoğalması ve çekirdeğe taşınması, hücre proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşumunda artışa neden olmaktadır. Bütün bu verilerden hareketle, FLNA'nın kesilmesi engellenirse yani eğer FLNA^{CT} üretimi down regüle edilirse, hücre proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşumu azalacaktır. Ayrıca FLNA'nın fosforillenmesi de, kalpain'e bağlı FLNA kesilmesini önleyebilir. Bu nedenle kanserde kontrolsüz hücre çoğalmasını önlemek için hem kalpeptin tedavisi kullanmak hem de FLNA'nın fosforillenmesini arttırmak daha avantajlı bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

Biliyoruz ki, kanser çok karmaşık bir süreçtir ve kanserin tek bir sinyal yolağı, molekül etkileşimi veya tek bir ilaç ile bastırılması çok zordur. Bu nedenle, daha etkili olan tedavilerin geliştirilmesi için tanımlanacak çok sayıda, yeni hedeflere ihtiyacımız vardır. Sonuç olarak bizim bu çalışmamızda kalpeptinin yalnızca T241, PC3, A7 ve MS1 hücrelerinde, kalpaini inhibe ederek hücre migrasyon ve invazyonunu azalttığını göstermiş olduk. Kalpain için yeni substratların tanımlanmasıyla birlikte, daha etkili kalpain müdahale stratejilerine ulaşma çalışmaları, tümör gelişiminin ilerlemesinin arkasındaki mekanizmaların daha iyi aydınlatılmasına yol açar. Sonuç olarak, kalpeptin kullanımı yoluyla kalpain aktivitesinin bloke edilmesi, kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılmasında etkili olan hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve koloni oluşumlarını inhibe etmektedir. Bu nedenle, FLNA^{CT}'in aracılık ettiği sinyal yollarını hedefleyen kalpain inhibitörlerini kullanmak, *in vivo* kanser hücre büyümesini inhibe etmek için elverişli bir yaklaşım sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı hücre hatlarında yapmış olduğumuz proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma denemelerinden elde ettiğimiz veriler, kalpeptin uygulamasının sonucunda, kalpain-bağımlı FLNA kesilmesinin azaldığını ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yeteneklerinin de azalmış olduğunu gösterdi. Bu çalışmadan çıkan en önemli sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. FLNA^{CT}'nin, farklı hücrelerin [PC3 (insan prostat kanseri), A7 (insan melanoma), T241 (fare fibrosarkoma) ve MS1 (fare endotel)] proliferasyon, migrasyon, invazyon ve koloni oluşturmalarına ilişkin süreçlerde etkili olduğuna dair bulgular elde edildi.

2. FLNA'nın fosforilasyonun seviyelerinin de kanser hücrelerindeki karsinogenez sürecini etkilediğini gösterdi.

3. Kalpain 1 ve 2 inhibitörü olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda değer gören kalpeptin'in, çalıştığımız hücrelerde, verimli bir şekilde kalpaini inhibe edebildiği ve böylelikle de FLNA'nın kesilmesini engelleyerek FLNA^{CT}'nin üretimini azalttığı saptanmış oldu.

Bu çalışmanın sonuçlarının daha ileri seviyeye taşınması için insan ve deney hayvanları ile yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşüncesindeyiz. İnsan ve deney hayvanları ile yapılacak çalışmalardan elde edilecek sonuçların, hücre hatları ile yapılan bu çalışmanın sonuçlarını desteklemesi durumunda, kanser hücrelerinde, kalpainin önemini ve dolayısıyla bir kalpain inhibitörü olan kalpeptinin kanser tedavisindeki rolü ve önemine ilişkin daha bariz ve aydınlatıcı bilgiler elde edilmiş olacaktır.

Diğer yandan, filaminler ile ilgili yapılacak daha ileri düzeydeki çalışmalarda, farklı kalpain inhibitörlerinin de denenmesi ve bu inhibitörlerin farklı hücrelerde kullanılması, filaminlerin ve hem kalpain hem de kalpain inhibitörlerinin kanser tedavisindeki rollerinin daha fazla açıklık kazanmasına neden olacaktır. Bu nedenle gerek deney hayvanları ve gerekse insandan alınan örneklerle yapılacak olan deneylerin çok değerli olacağı kanısındayız.

Bu bağlamda bizim çalışmamız kanserle ilgili araştırma ve araştırmacılara temel bir dayanak oluşturacak ve küçük de olsa çok önemli katkılar sağlayacak bir araştırma niteliği taşımaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Zhou AX, Toylyu A, Nallapalli RK, Nilsson G ve ark. Filamin a mediates HGF/c-MET signaling in tumor cell migration. *Int J Cancer*. 2011; 128 (4): 839-46.
2. Zhou X, Borén J, Akyürek LM. Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*. 2007; 17(7): 222-9.
3. Bandaru S, Grönros J, Redfors B, Çil Ç ve ark. Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2015; 105 (2): 151-9.
4. Zhou AX, Hartwig JH and Akyürek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in cell biology*. 2010; 20(2): 113-123.
5. https://www.researchgate.net/publication/260253949_Hypoxia-induced_and_calpain_dependent_cleavage_of_filamin_A_regulates_the_hypoxic_response/figures
6. <https://www.scbt.com/scbt/product/calpeptin-117591-20-5>
7. http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Calpain-Inhibitor-III-CAS-88191-84-8-Calbiochem,EMD_BIO-208722?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F
8. Nakamura F, H. Hartwig JH, Stossel TP, and Szymanski PT. Ca²⁺ and calmodulin regulate the binding of filamin A to actin filaments. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2005; 280(37): 32426 –32433.
9. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH ve ark. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(2): 138-45.
10. Feng Y, Walsh CA. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(11): 1034-8.
11. Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M ve ark. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*. 1990; 111(3): 1089-105.

12. Zheng X, Zhou AX, Rouhi P, Uramoto H ve ark. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(7): 2560-5.
13. Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, Hartwig JH, Stossel TP. Structural basis of filamin A functions. *J Cell Biol*. 2007; 179(5): 1011-25.
14. Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(5): 2122-8.
15. Vadlamudi RK, Li F, Adam L, Nguyen D, Ohta Y ve ark. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(9): 681-90.
16. Watanabe T, Yoshida N, Satake M. Biological implications of filamin A-bound PEBP2b/CBFb retention in the cytoplasm. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2005; 15(3): 197-206.
17. Yoshida N, Ogata T, Tanabe K, Li S ve ark. Filamin A-bound PEBP2beta/CBFbeta is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(3): 1003-12.
18. Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 2001; 276(21): 17871-7.
19. Yuan Y, Shen Z. Interaction with BRCA2 suggests a role for filamin-1 (hsFLNa) in DNA damage response. *J Biol Chem*. 2001; 276(51): 48318-24.
20. Berry FB, O'Neill MA, Coca-Prados M, Walter MA. FOXC1 transcriptional regulatory activity is impaired by PBX1 in a filamin A-mediated manner. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(4): 1415-24.
21. Wang Y, Kreisberg JI, Bedolla RG, Mikhailova M ve ark. A 90 kDa fragment of filamin A promotes Casodex-induced growth inhibition in Casodex-resistant androgen receptor positive C4-2 prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007; 26(41): 6061-70.
22. Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L ve ark. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(10): 1618-26.

23. Loy CJ, Sim KS, Yong EL. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(8): 4562-7.
24. Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(5): 364-74.
25. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallàs M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev*. 2006; 12(2): 135-48.
26. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC and Sharma RK. Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13: 1604-1609.
27. Kimura Y, Koga H, Araki N, et al The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med*. 1998; 4: 915-922.
28. Mamoune A, Luo JH, Lauffenburger DA and Wells A: Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res*. 2003; 63: 4632-4640.
29. Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, et al: The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 1372-1379.
30. Liu T, Wu LY, Fulton MD, Johnson JM and Berkman CE. Prolonged androgen deprivation leads to downregulation of androgen receptor and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2012; 41: 2087-2092.
31. Liu T, Mendes DE, Berkman CE. Prolonged androgen deprivation leads to overexpression of calpain 2: implications for prostate cancer progression. *Int J Oncol*. 2014 Feb; 44(2): 467-72.
32. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological, pathological involvement. *FASEB J*. 1994; 8: 814-822.
33. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 1997; 328: 721-732.
34. Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function?. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 247: 193-203.

35. Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem.* 2001; 129: 653–664.
36. Huang Y, Wang KKW. The calpain family and human disease. *Trend Mol Med.* 2001; 7: 355–362.
37. Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 1999; 18: 6880–6889.
38. Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber H ve ark. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 588–592.
39. Moldveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A Ca^{2+} switch align the active site of calpain. *Cell.* 2002; 108: 649–660.
40. Reverter D, Strobl S, Fernandez-Catalan C, Sorimachi H, Suzuki K, Bode W. Structural basis for possible calcium-induced activation mechanism of calpains. *Biol Chem.* 2001; 382: 753–766.
41. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kimbara K, Ishiura S. Calpain: novel family members, activation and physiological function. *Biol Chem.* 1995; 376: 523–529.
42. Nakagawa K, Masumoto H, Sorimachi H, Suzuki K: Dissociation of m-calpain subunits after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J Biochem.* 2001; 130: 605–611.
43. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes.* 2004; 53 (1): 12-8.
44. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8999?lang=en®ion=TR>
45. Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T ve ark. Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer–stromal interactions in a mouse xenograft model. *Cancer Sci.* 2016; 107(10): 1443-1452.

46. Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. *FEBS Lett.* 1993; 323(1-2): 151-4.
47. Fujitani K, Kambayashi J, Sakon M, Ohmi SI ve ark. Identification of mu-, m-calpains and calpastatin and capture of mu-calpain activation in endothelial cells. *J Cell Biochem.* 1997 Aug 1; 66(2): 197-209.
48. Bassé F, Gaffet P, Bienvenüe A. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? . *Biochim Biophys Acta.* 1994 Mar 23; 1190 (2): 217-24.
49. <http://docs.abcam.com/pdf/protocols/general-western-blot-protocol.pdf>
50. <http://webb.deu.edu.tr/arlab/images/protokoller/wb.pdf>
51. <https://www.creative-diagnostics.com/The-Basis-of-Western-Blot.htm>
52. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
53. Calvin R.J, Nancy L, Maria R.E, Li V.Y. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp.* 2014; (88): 51046.
54. http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/an_Chemotaxis_protocol.pdf
55. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242011000100003
56. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006; 1(5): 2315-9.
57. <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
58. Storr SJ, Thompson N, Pu X, Zhang Y, and Martin SG: Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. *Pathobiology.* 2015; 82: 133–141.

59. Marciel MP, Rose AH, Martinez V, Horio DT, Hashimoto AS, Hoffmann FW, Bertino P, and Hoffmann PR: Calpain-2 inhibitor treatment preferentially reduces tumor progression for human colon cancer cells expressing highest levels of this enzyme. *Cancer Med.* 2018; 7: 175–183.
60. Tabata C, Tabata R, and Nakano T: Calpeptin Prevents Malignant Pleural Mesothelioma Cell Proliferation via the Angiopoietin1/Tie2 System. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17: 3405–3409.
61. Yang H, Murthy S, Sarkar FH, Sheng S, Reddy GP, and Dou QP: Calpain-mediated androgen receptor breakdown in apoptotic prostate cancer cells. *J Cell Physiol.* 2008; 217: 569-576.
62. Moretti D, Del Bello B, Allavena G, and Maellaro E: Calpains and cancer: friends or enemies? *Arch Biochem Biophys.* 2014; 564: 26–36.
63. Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, and Walsh CA: Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 19836–19841.
64. Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V ve ark: Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet.* 2003; 33: 487–491.
65. Zhou X, Tian F, Sandzen J, Cao R ve ark. Filamin B deficiency in mice results in skeletal malformations and impaired microvascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 3919–3924.
66. www.proteinatlas.org/

8.EKLER

Ek-1. Etik Kurul Raporu

Subject: Yönetim Kurulu Kararı (41) 16.11.2017 (Reza SALİMİ'nin tez önerisi hk.)

From: saglikbil.ogrenci@deu.edu.tr

To: RezaSalimitr@yahoo.com

Cc: elif.pturk@deu.edu.tr; asiye.zengin@deu.edu.tr; nilgun.yener@deu.edu.tr; huray.islekel@deu.edu.tr

Date: Thursday, November 23, 2017, 1:15:19 PM GMT+1

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI : 41

TOPLANTI GÜNÜ: Perşembe

TOPLANTI TARİHİ : 13.11.2017

TOPLANTI SAATİ: 11.00

KARAR 02/ Enstitümüz Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp doktora programı öğrencisi **Reza SALİMİ'nin** 08.11.2017 tarihli dilekçesi ile ekindeki (2.Danışman) **Prof.Dr. Levent AKYÜREK'ten** gelen 27.11.2017 tarihli yazısı okundu. Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp doktora programı öğrencisi Reza SALİMİ'nin, Danışmanı ve Anabilim Dalı Başkanının onayı ile tez başlığı "Filamin Proteinlerinin Hücrelerdeki İşlevlerinin Araştırılması" olarak değiştirilen tezine ait çalışmaların, İsveç-Göteborg Üniversitesinde yürütüleceği ve Göteborg Üniversitesindeki hücre kültürü çalışmaları için Etik Kurul onayı gerekmeyeceği için öğrencinin tezi için etik kurul onayı aranmamasına mevcudun oybirliği ile karar verildi.

Ek-2. ÖZGEÇMİŞ

REZA SALİMİ

TC Kimlik No/ Pasaport No:	99079285920
Doğum Yılı:	19/04/1983
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, Türkiye
Telefon:	00905466337045
Faks:	-
e-posta:	rezasalimitr@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
İran	Shahriyar shahre gods Azad Üniversitesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji - Mikrobiyoloji	Lisans	2005
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Yüksek Lisans	2013
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Doktora	2013-2018

EK 3. YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan

Babaie F, Hasankhani M, Mohammadi H, Safarzadeh E, Rezaieyanesh A, Salimi R, Baradaran B, babaloo Z. The role of Gut Microbiota and IL-23/IL-17 Pathway in ankylosing spondylitis immunopathogenesis: new insights and updates. *Immunol Lett.* 2018 Feb 1. pii: S0165-2478(17)30570-9.

Salimi R, Yener N, Safari R. Use and Evaluation of Newly Synthesized Fluorescence Probes to Detect Generated OH• Radicals in Fibroblast Cells. *J Fluoresc.* 2016 May;26(3):919-24.

Safari R, Salimi R, Tunca Z, Ozerdem A, Ceylan D, Sakizli M. Mutation/SNP analysis in EF-hand calcium binding domain of mitochondrial Ca²⁺ uptake 1 gene in bipolar disorder patients. *J Integr Neurosci.* 2016 Jun;15(2):163-73.

Bandaru S, Grönros J, Redfors B, Çil Ç, Pazooki D, Salimi R, Larsson E, Zhou AX, Ömerovic E, Akyürek LM. Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2015 Feb 1;105(2):151-9.

EK 4. Tezin yayınlanması 1. yayın, kabul edilmiş (Anticancer research, Mart 2018)

Blocking the Cleavage of Filamin A by Calpain Inhibitor Decreases Tumor Cell Growth

REZA SALIMI^{1,2}, SASHIDHAR BANDARU¹, SRAVANI DEVARAKONDA¹, SEVTAP
GÖKALP¹, CHANDU ALA¹, ALI ALVANDIAN², NILGÜN YENER³, LEVENT M.
AKYÜREK^{1,4}

¹*Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; Departments of ²Molecular Medicine and ³Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Dokuz Eylül, Izmir, Turkey; ⁴Department of Clinical Pathology and Genetics, Sahlgrenska Academy Hospital, Gothenburg, Sweden.*

Correspondence to: Levent M. Akyürek, Sahlgrenska Academy Hospital, Department of Clinical Pathology and Genetics, Gula stråket 8, 413 45 Göteborg, Sweden. Tel: +46 31 3426667, e-mail: levent.akyurek@gu.se.

Key Words: Calpain, migration, proliferation, colony formation.

Abstract. Filamin A (FLNA) is the most abundant and widely expressed isoform of filamin in human tissues. It is cleaved by calpain at the hinge 1 and 2 domains, producing a 90 kDa carboxyl-terminal fragment (FLNA^{CT}). Recently, it has been shown that FLNA^{CT} mediates cell signaling and transports transcription factors into the cell nucleus. However, the significance of the cleavage of FLNA by calpain has not been studied in cancer cell growth. Calpeptin is a chemical inhibitor of both calpain 1 and 2 that cleaves FLNA. In this study, we questioned if inhibiting calpain using calpeptin would decrease tumor cell proliferation, migration, invasion, and colony formation. Human melanoma (A7), prostate cancer (PC3), mouse fibrosarcoma (T241) and endothelial (MS1) cells were assayed for proliferation, migration, invasion and colony formation after treatment with calpeptin. Cell lysates were immunoblotted for FLNA and FLNA^{CT}. Calpeptin treatment of these cells resulted in decreased production of FLNA^{CT}. Calpeptin-treated human and mouse tumor cells displayed impaired proliferation, migration, and colony formation. These data suggest that the cleavage of FLNA by calpain is an important cellular event in the regulation of tumor cell growth.

Introduction

Filamins are one of the actin binding proteins that are responsible for stabilizing the actin skeleton and connecting them to the cell membrane (1-3). Filamins bind and interact with cytoplasmic and cell membrane proteins with diverse functions, and are responsible for the dynamic remodeling of the actin cytoskeleton, which is essential for the formation and maintenance of cell shape, regulation of cell morphology and locomotion (1, 4). Different studies in cancer cell lines showed that FLNA regulates the expression of growth factors during cell migration and invasion in human lung (5), breast cancer (6), squamous cell carcinoma (7) and glioma cells (8). Mutations in the human *FLNA* gene associate with a diverse range of developmental malformations. Null mutations lead to defect in neuronal migration, vascular function, and connective tissue integrity (3).

FLNA is expressed in wide range of cells (9). The full-length FLNA is a 280 kDa protein consists of an N-terminal actin binding domain and a rod segment with 24 homologous Ig-like

repeats. Each repeat has 96 amino acids interrupted with two hinge (H) domains between repeats 15 and 16 (H1) and between repeats 23 and 24 (H2) (10). Cleavage of FLNA by the calcium-dependent protease calpain in H1 produces a 110 kDa C-terminal fragment (FLNA^{CT}). Further cleavage of the 110 kDa C-terminal fragment in the H2 domain can yield a 90 kDa FLNA^{CT}, which can translocate to the cell nucleus (11, 12). During apoptosis, caspase (13) and granzyme B (14) can also cleave FLNA, generating different fragments than those resulting from proteolysis by calpain. Phosphorylation of FLNA can prevent its cleavage (11). Calpains are a highly conserved superfamily of calcium-dependent, non-lysosomal cysteine proteases. Calpain 1 (μ -calpain) and calpain 2 (m-calpain) are two well-known and characterized members of the calpain family (15). Calpeptin is a calpain 1/2 inhibitor which can inhibit FLNA cleavage (16).

Many studies have focused on the function and expression of FLNA, but less is known about the importance of the cleavage of FLNA and the production of FLNA^{CT} in tumor cell function. In addition, the specific role of FLNA^{CT} in tumor cell migration, invasion and proliferation is not clarified. In this study, we focused on the role of FLNA^{CT} in the multiple human and mouse cancer cells.

Materials and Methods

Cell culture. Human melanoma A7 cells were cultured in Eagle's MEM, supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin and 10 mM HEPES. Human prostate cancer PC3 cells were cultured in RPMI-1640, supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES and 1 mM sodium pyruvate. Mouse endothelial MS1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 5% FBS, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin. Mouse fibrosarcoma T241 cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 1% penicillin/streptomycin. Calpeptin was obtained from Sigma-Aldrich, dissolved in DMSO and cells were treated with calpeptin at a dose of 100 μ M or DMSO alone as control.

Western blotting. Antibodies against FLNA (Bethyl Laboratories), FLNA^{CT} (Novus Biosciences), and ACTIN (Sigma) were used. Total protein lysates from cells were extracted and immunoblotted as previously described (2).

Migration assay. Migration assays were carried out after the third passage in all cell lines in transwell chambers (8 μm pores in diameter). Approximately 5×10^4 cells were seeded in the upper chamber containing 200 μl serum free medium and lower chamber containing 750 μl medium of 10% FBS. After 16-20 h of incubation at 37°C, migrated cells were fixed and stained according to the manufactures protocol (Sigma-Aldrich). All cells that had migrated through the transwell chambers were counted by using a light microscope. Triplicates of each experiment are presented as mean \pm SD values.

Invasion assay. The invasion assays were carried out by counting the number of invaded cells through matrigel-coated transwell chambers. Approximately 5×10^4 cells were seeded in the upper chamber with 200 μl serum free medium, lower chamber containing 750 μl medium with 10% FBS. After 16-20 h of incubation at 37°C, invaded cells were fixed and stained according to manufactures protocol (Sigma-Aldrich). All cells that had invaded through the transwell chambers were counted by using a light microscope. Triplicates of each sample are presented as mean \pm SD values.

Colony-forming assay. 500 μl /well of 0.6% sea plaque agarose in 10% serum culture medium added to 24-well cell culture plates and waited to solidification. Approximately 2×10^3 cells were suspended in 500 μl of 0.4% agarose in culture medium containing 10% serum supplemented with or without 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ of calpeptin and seeded into each well and after solidification added 500 μl of medium containing 10% serum and cells were incubated at 37°C for 30 days. Top medium were changed at every 5-day intervals. By the end of day 30 all colonies were counted from 12 optical fields from each well under a phase contrast microscope.

Proliferation MTT assay. 5×10^4 cells in 100 μl medium containing 10% serum were seeded in 96-well plates and incubated for overnight with and without calpeptin treatment. After 24 hours an absorbance reading was recorded at 570 nm using a 96-well plate reader (Biotek) according to

manufactures protocol (Promega MTT-CellTiter 96[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) protocol. Results of triplicate experiments are given as mean \pm SD values.

Statistical analysis. Data are given as mean \pm standard deviation (SD). Differences between experiment groups were analyzed for statistical significance ($P < 0.05$) using Student's *t* test.

Results

Treatment with calpeptin reduces cleavage of FLNA^{CT}

To determine if treatment with calpeptin at a dose of 100 μ M inhibited cleavage of FLNA and resulted in less production of FLNA^{CT}, we immunoblotted protein lysates from multiple human and mouse cells; human A7 melanoma and PC3 prostate cancer, and mouse T241 fibrosarcoma and MS1 endothelial cells. Control groups were treated with 100 μ M of DMSO. Immunoblotting using anti-actin antibodies served as loading controls, and ratios of FLNA^{CT}/ACTIN were calculated after quantification of the densitometric reading of the bands. Following treatment with calpeptin, we observed significantly lower levels of FLNA^{CT} in A7 cells by 66,6% ($P < 0,05$), PC3 cells by 41,9% ($P < 0,05$), T241 cells by 43,3% ($P < 0,05$) and MS1 cells by 60,9% ($P < 0,01$) (Figure 1).

Tumor cells proliferate less after treatment with calpeptin

To determine if blocking of the proteolysis of FLNA by calpain reduced cell proliferation, we treated cells with calpeptin at a dose of 100 μ M or DMSO alone and protein lysates were assayed by MTT one day after their seeding in cell culture dishes. Treatment of cells with calpeptin significantly reduced the proliferation rate in A7 cells by 86,5% ($P < 0,01$), PC3 cells by 60,4% ($P < 0,01$), T241 cells by 74,1% ($P < 0,01$) and MS1 cells by 37,4% ($P > 0,05$) (Figure 2).

Inhibition of calpain by calpeptin treatment impairs tumor cell migration and invasion

To study if calpeptin treatment reduced cell migration and invasion, we treated A7, PC3, T241 and MS1 cells with 100 μ M of calpeptin or 100 μ M of DMSO and assayed these cells for migration and invasion using Boyden chambers. Treatment of cells with calpeptin significantly reduced cellular migration of A7 cells by 82,1% ($P < 0,01$), PC3 cells by 60,8% ($P < 0,01$), T241

cells by 50,5% ($P < 0,01$) and MS1 cells by 91,3% ($P < 0,01$) (Figure 3). Similarly, treatment of cells with calpeptin significantly reduced cellular invasion of A7 cells by 86,2% ($P < 0,01$), PC3 cells by 29,8% ($P < 0,05$), T241 cells by 38,2% ($P < 0,01$) and MS1 cells by 24,3% ($P < 0,01$) (Figure 4).

Tumor cells form less number of colonies after treatment with calpain

To assay the ability of tumor cells to form colonies, A7, PC3, T241, and MS1 cells were treated either with calpeptin at a dose of 100 μ M or DMSO at a dose of 100 μ M. After four weeks, calpeptin treatment showed complete inhibition of colonies ($P < 0,01$) in A7, PC3 and T241 tumor cells (Figure 5). MS1 endothelial cells were unable to form colonies in both control and treated groups.

Discussion

In this study, we report that 90 kDa fragment of FLNA^{CT}, generated following the proteolysis of FLNA by calpain, mediates tumor cell proliferation, migration, invasion, and colony formation. We demonstrate that the treatment of tumor cells with calpeptin inhibits cleavage of FLNA and decreases the production of FLNA^{CT}. The level of these inhibitory effects was different between the malignant and non-malignant cells.

Therapeutic strategies targeting calpains have been developed. Recent data suggest that targeting calpain activity with specific inhibitors seems to be a novel approach to limiting the development of primary tumors and the formation of metastases. This occurs by inhibiting tumor cell migration and invasion, which allows dissemination as well as tumor neovascularization, which in turn allows expansion (17). For these reasons, calpains are considered by several studies as potential anti-cancer targets. The beneficial effect of blocking the calpain system has been reported in multiple human cancer cells, including breast (18), colon (19), pleural mesothelioma (20), pancreas (21), and prostate (22) cancers. In addition, several human cancers display aberrant expression of calpains (23). Calpain substrates include cytoskeletal and associated proteins, kinases and phosphatases, membrane receptors and transporters, and steroid receptors (23). Our

data identified FLNA as substrate of calpain in human cancer cells and provided evidence that the cleavage of FLNA mediates cancer cell behavior.

The loss of FLNA in mouse embryonic fibroblasts (2) and endothelial cells (1) impairs cellular migration. Cellular migration is an important event for these embryonic cells, which need to relocate to form organs and structures during embryogenesis, and also to regenerate in response to physiological stimuli. When these cells fail to reach appropriate anatomical locations, organ development stalls leading to severe malformations in the cardiovascular and skeletal system (24). In human, mutations in the *FLNA* gene are associated with early embryonic lethality and developmental complications (25). There are three different isoforms of filamin; FLNA, FLNB and FLNC. Structurally, FLNA and FLNB are similar to each other, but the loss of one of these isoforms does not compensate for the other, as a single loss of either FLNA (24) or FLNB (26) results in embryonic lethality. In the absence of FLNB, FLNA expression is not increased in mouse fibroblasts (26) or *vice versa* (24).

We have earlier shown that melanoma cancer cells migrate less in the absence of FLNA (13). FLNA interacts with multiple molecules regulating intracellular signaling pathways within the cytoplasm and/or transcription factors within the nucleus. We reported that the transcriptional factor HIF-1 α is an interacting partner of FLNA^{CT} in tumor cells and FLNA^{CT} mediates nuclear transportation of HIF-1 α and becomes a part of the transcriptional complex within the nucleus (13). Interestingly, inhibition of calpain reduces the secretion of VEGF. The number of FLNA partners is increasing (4). These interacting partners are expressed at different levels depending upon cell type and the environment in which tumor cells have been exposed to different stimuli. In this study, cell-specific partners of FLNA mediating different mechanisms may explain the distinct inhibitory effects in tumor cells. Furthermore, the level of FLNA expression varies depending upon the type of cancer (www.proteinatlas.org/).

The identification of new substrates and the mechanisms behind the progression of tumor growth will result in more effective calpain intervention strategies. In conclusion, blocking calpain activity through the use of calpeptin inhibited cell proliferation, migration and colony formation that are important features for tumor cell growth. Therefore, using chemical inhibitors of calpain which targeting signaling pathways mediated by FLNA^{CT} would likely provide a favorable approach to inhibit cancer cell growth *in vivo*.

Acknowledgements

We acknowledge the support from the Sahlgrenska Hospital Funds and Swedish Cancer Society (to L.M.A.) and thank Kerryn Elliott for linguistic work.

Figure Legends

Figure 1. *Production of FLNA^{CT} was inhibited after treatment with calpeptin. Immunoblots of full-length FLNA (1-24), FLNA^{CT} (16-24), and ACTIN in A7, PC3, T241, and MS1 cells treated with calpeptin (100 μ M) or with DMSO alone (left panels). Quantification of densitometric readings of the immunoblot bands (right graph). FLNA^{CT}/Actin ratios in calpeptin-treated cells were normalized to their respective control group. Data from triplicate experiments are presented as mean \pm SD values. Unpaired two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.*

Figure 2. *Inhibition of calpain by calpeptin treatment impaired cellular proliferation. T241, PC3, A7 and MS1 cells were treated with calpeptin (100 μ M) and cell lysates were assayed for proliferation by MTT at day 1 (left panels). Percentages in treated groups with calpeptin were normalized to their respective control group (right graph). Data from triplicate experiments are presented as mean \pm SD values. Unpaired two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.*

Figure 3. *Treatment with calpeptin inhibited cellular migration. T241, PC3, A7 and MS1 cells showed reduced migration after 16 hours following calpeptin treatment at a dose of 100 μ M compared to respective controls (left panels). Percentages in treated groups with calpeptin were normalized to their respective control group (right graph). Data from triplicate experiments are presented as mean \pm SD values. Unpaired two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.*

Figure 4. Cells display impaired invasion after treatment with calpeptin. T241, PC3, A7 and MS1 cell lines invasive poorly after 16 hours following treatment with calpeptin at a dose of 100 μ M compared to respective controls (left panels). Percentages in treated groups with calpeptin were normalized to respective control group (right graph). Data of triplicated experiments are presented as mean \pm SD values. Unpaired two-tailed Student's *t*-test, **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

Figure 5. Calpeptin treatment reduced the number of invasive colonies. Formed colonies in T241, PC3 and A7 cell treated with calpeptin at a dose of 100 μ M (left panels). Total number of colonies in each group (right graph). Data from triplicate experiments are presented as mean \pm SD values. Unpaired two-tailed Student's *t*-test, ***P* < 0.01.

References

- 1 Bandaru S, Grönros J, Redfors B, Cil C, Pazooki D, Salimi R, Larsson E, Zhou AX, Ömerovic E, and Akyürek LM: Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 105: 151–159, 2015.
- 2 Zhou AX, Toylu A, Nallapalli RK, Nilsson G, Atabey N, Heldin CH, Boren J, Bergo MO, and Akyürek LM: Filamin a mediates HGF/c-MET signaling in tumor cell migration. *Int J Cancer* 128: 839–846, 2011.
- 3 Zhou X, Borén J, and Akyürek LM: Filamins in cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* 17: 222–229, 2007.
- 4 Zhou AX, Hartwig JH, and Akyürek LM: Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 20: 113–123, 2010.
- 5 Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, Anthwal S, Strahler JR, Walker A, Arenberg DA, Reddy RC, Akulapalli S, Thannickal VJ, Standiford TJ, Andrews PC, and Omenn GS: Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells

- undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *J Proteome Res* 5: 1143–1154, 2006.
- 6 Ravid D, Chuderland D, Landsman L, Lavie Y, Reich R, and Liscovitch M: Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-1-stimulated cancer cell migration. *Experimental Cell Research* 314: 2762–2773, 2008.
 - 7 Kamochi N, Nakashima M, Aoki S, Uchihashi K, Sugihara H, Toda S, and Kudo S: Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell carcinoma under cancer-stromal cell interaction. *Cancer Science* 99: 2417–2427, 2008.
 - 8 McDonough WS, Tran NL, and Berens ME: Regulation of glioma cell migration by serine-phosphorylated P311. *Neoplasia* 7: 862–872, 2005.
 - 9 Berrou E, Adam F, Lebret M, Planche V, Fergelot P, Issertial O, Couptry I, Bordet JC, Nurden P, Bonneau D, Colin E, Goizet C, Rosa JP, and Bryckaert M: Gain-of-Function Mutation in Filamin A Potentiates Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37: 1087–1097, 2017.
 - 10 Travis MA, van der Flier A, Kammerer RA, Mould AP, Sonnenberg A, and Humphries MJ: Interaction of filamin A with the integrin β7 cytoplasmic domain: role of alternative splicing and phosphorylation. *FEBS Lett* 569: 185–190, 2004.
 - 11 Mooso BA, Vinall RL, Tepper CG, Savoy RM, Cheung JP, Singh S, Siddiqui S, Wang Y, Bedolla RG, Martinez A, Mudryj M, Kung HJ, Devere White RW, and Ghosh PM: Enhancing the effectiveness of androgen deprivation in prostate cancer by inducing Filamin A nuclear localization. *Endocr Relat Cancer* 19: 759–777, 2012.
 - 12 Planaguma J, Minsaas L, Pons M, Myhren L, Garrido G, and Aragay AM: Filamin A-hinge region 1-EGFP: A novel tool for tracking the cellular functions of filamin A in real-time. *Plos One* 72012.
 - 13 Zheng X, Zhou AX, Rouhi P, Uramoto H, Boren J, Cao Y, Pereira T, Akyürek LM, and Poellinger L: Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2560–2565, 2014.
 - 14 Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, and Hartwig JH: Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111: 1089–1105, 1990.

- 15 Hastings MH, Gong K, Freibauer A, Courchesne C, Fan X, and Sossin WS: Novel calpain families and novel mechanisms for calpain regulation in *Aplysia*. *PLoS One* 12: e0186646, 2017.
- 16 Liu TC, Mendes DE, and Berkman CE: Prolonged androgen deprivation leads to overexpression of calpain 2: Implications for prostate cancer progression. *International Journal of Oncology* 44: 467–472, 2014.
- 17 Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, and Martin SG: The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 364–374, 2011.
- 18 Storr SJ, Thompson N, Pu X, Zhang Y, and Martin SG: Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. *Pathobiology* 82: 133–141, 2015.
- 19 Marciel MP, Rose AH, Martinez V, Horio DT, Hashimoto AS, Hoffmann FW, Bertino P, and Hoffmann PR: Calpain-2 inhibitor treatment preferentially reduces tumor progression for human colon cancer cells expressing highest levels of this enzyme. *Cancer Med* 7: 175–183, 2018.
- 20 Tabata C, Tabata R, and Nakano T: Calpeptin Prevents Malignant Pleural Mesothelioma Cell Proliferation via the Angiotensin II/Tie2 System. *Asian Pac J Cancer Prev* 17: 3405–3409, 2016.
- 21 Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T, Zheng B, Torata N, Fujita H, Nabae T, Manabe T, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, and Nakamura M: Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model. *Cancer Sci* 107: 1443–1452, 2016.
- 22 Yang H, Murthy S, Sarkar FH, Sheng S, Reddy GP, and Dou QP: Calpain-mediated androgen receptor breakdown in apoptotic prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 217: 569–576, 2008.
- 23 Moretti D, Del Bello B, Allavena G, and Maellaro E: Calpains and cancer: friends or enemies? *Arch Biochem Biophys* 564: 26–36, 2014.
- 24 Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, and Walsh CA: Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 19836–19841, 2006.

- 25 Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwrick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO, and Group OP-sDCC: Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 33: 487–491, 2003.
- 26 Zhou X, Tian F, Sandzen J, Cao R, Flaberg E, Szekely L, Cao Y, Ohlsson C, Bergo MO, Borén J, and Akyürek LM: Filamin B deficiency in mice results in skeletal malformations and impaired microvascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3919–3924, 2007.



EK 5. Tez ile ilgili dergiye gönderilmiş 2. yayın (Circulation)

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Cleavage of Filamin A in Macrophages Regulates STAT3/IL-6 Signaling and Induces Size of Aortic Atherosclerotic Plaques

Sashidar Bandaru, MSc

Reza Salimi, MSc

Murali K. Akula, MSc

Chandu Ala, MSc

Matias Ekstrand, MSc

Sravani Devarakonda, MSc

Joakim Karlsson, MSc

Max Levin, MD, PhD

Jan Borén, MD, PhD

Martin O. Bergo, PhD

Levent M. Akyürek, MD, PhD

Correspondence to Levent Akyürek, Department of Clinical Pathology and Genetics, Sahlgrenska Academy Hospital, Göteborg, Sweden. E-mail levent.akyurek@gu.se.

Key Words: filamin ■ atherosclerosis ■ macrophage ■ calpain ■ calpeptin

ABSTRACT

BACKGROUND: Actin-binding protein filamin A (FLNA) regulates signal transduction important for cell locomotion, but the role of FLNA during atherogenesis has not been explored. We found that FLNA is exclusively expressed by macrophages (MΦ) in human atherosclerotic plaques.

METHODS: To determine the biological significance of MΦ-specific expression of FLNA, we produced mice deficient for *Flna* in MΦ by cross-breeding mice expressing floxed *Flna* (*Flna^{fl/fl}*) with mice expressing Cre under the MΦ-specific lysosome M promoter (LC) and then transplanted bone-marrow (BMT) from male (*Flna^{o/fl}/LC*) mice into atherogenic low-density lipoprotein receptor-deficient (*ldlr^{-/-}*) recipients. In another model of atherogenesis, *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* male mice were infected with AdPCSK9. Furthermore, wild-type C57BL/6 mice infected with AdPCSK9 were treated with a calpain inhibitor, calpeptin.

RESULTS: *Flna^{o/fl}/LC* MΦ showed impaired proliferation and migration as well as expressed lower levels of p-AKT and p-ERK1/2. Deficiency of *Flna* in MΦ produced smaller size of aortic atherosclerotic plaques in both *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}/LC* and *Flna^{o/fl}/LC* mice infected with AdPCSK9. Intima/media ratios and number of CD68-positive MΦ were reduced in these plaques. Inhibition of FLNA cleavage by calpeptin reduced nuclear expression of p-STAT3 and secretion of proinflammatory IL-6 *in vitro*. In addition, *Flna^{o/fl}/LC* MΦ showed reduced foam cell formation and lipid uptake. Treatment of *Flna^{o/fl}* MΦ with calpeptin reduced foam cell formation and lipid uptake. Finally, C57BL/6 mice infected with AdPCSK9 displayed reduced size of atherosclerotic plaques after treatment with calpeptin.

CONCLUSIONS: Deletion of *Flna* or inhibition of FLNA cleaved by calpain in MΦ reduced atherosclerotic plaque size as a result of impaired MΦ function and signaling.

INTRODUCTION

Filamin A (FLNA) is a large actin-binding protein that stabilizes delicate three-dimensional actin filament networks and link them to cellular membranes where they integrate cell architectural and signaling functions important for cell locomotion.¹ Genetic mutations in the human *FLNA* have been linked to a wide range of human genetic disorders, including cardiovascular malformations,² highlighting distinct FLNA interactions with vascular cell signaling molecules and transcriptional factors with diverse functions. In mice, *Flna*-null embryos display abnormal endothelial organization and aberrant adherens junctions in developing organs including blood vessels and heart.³

Atherosclerosis is a type of slow progressing inflammatory disease characterized by the presence of monocyte-derived macrophages (MΦ) in all stages.⁴ However, migration and proliferation of monocytes after they enter the artery wall within the atherosclerotic plaques is not completely understood. MΦ act on cells directly and/or potentiate the effects entrained by other stimuli and also secrete soluble proinflammatory and anti-inflammatory cytokines based on their roles in inflammation. The overlap of inflammatory processes operating in atherosclerosis and the rich presence of MΦ within the plaques make MΦ a strong candidate for therapeutic targeting in atherosclerosis.⁴ Another hallmark of atherosclerosis is that the MΦ uptake of oxidized lipids, differentiate into foam cells, progress lesion development, and ultimate plaque disruption. Foam cell formation involves the disruption of normal MΦ cholesterol metabolism, which is governed by a homeostatic mechanism that controls the uptake, intracellular metabolism, and efflux of cholesterol. A better understanding of macrophage cell biology will enable novel MΦ targeting therapies to be developed for use in the clinical intervention of atherosclerosis.

In this study, we investigated how inactivation of FLNA in macrophages affects the development of atherosclerosis in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient (*ldlr*^{-/-}) mice received BMT or in mice became atherogenic after infection with AdPSC9. We hypothesized that knockout of *Flna* in MΦ would impair atherosclerosis. This hypothesis was based on three observations. First, MΦ lacking FLNA exhibit reduced inflammatory response that would likely inhibit lesion development.⁵ Second, inhibiting regulation of intracellular actin dynamics in MΦ has been proposed as a strategy to reduce inflammation and to treat atherosclerosis.⁶ Third, lipid

uptake in the vasculature is partly dependent upon cytoskeletal reorganization mediated by FLNA.⁷ We then treated atherogenic mice with an inhibitor of calpain, cleaving FLNA and producing a 100-kDa C-terminal fragment (FLNA^{CT}) that interacts with important molecules involved in cellular signaling and transcription.⁸ We hypothesized that inhibition of cleavage of FLNA by calpain would inhibit development of atherosclerosis in mice. This hypothesis was based on our earlier observations on the inhibitory effect of calpain blockage in cellular signaling during proliferation and migration.



METHODS

Human carotid arteries

Human carotid endarterectomies⁹ displaying either intermediate (n = 9) or advanced (n = 9) atherosclerotic plaques were immunofluorescently stained with antibodies recognizing CD68-positive MΦ (DAKO), FLNA (Bethyl laboratories), smooth muscle-specific α -actin (Sigma Aldrich), and CD31-positive endothelial cells (DAKO) on the same sections. Nuclear staining was done by DAPI.

Mice

To produce mice that are deficient for *Flna* in MΦ, female C57BL/6 mice homozygously expressing floxed *Flna* gene (*Flna*^{fl/fl})¹⁰ were crossbred with the male mice heterozygously expressing Cre under the monocyte-specific lysomozyme-M promoter (LC). For experiments, mice were genotyped as described earlier.¹¹

Primary murine bone marrow macrophages

Primary MΦ were isolated from bone marrow of mice expressing *Flna* (*Flna*^{o/fl}) or lacking *Flna* (*Flna*^{o/fl}/LC) as described.⁶ MΦ lysates were assayed by immunoblotting as described earlier.¹² Primary antibodies directed against FLNA (Chemicon, Bethyl laboratories and Novus biologicals), P-STAT3 (Cell Signalling), STAT3 (Cell Signalling), p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2 (Cell Signaling), SR-B1 (Santa Cruz), LXR α/β , CD36, COX2, ABCG1, and ABCA1 (Novus biologicals) were used for immunoblotting. The band densities bands were quantified by ImageQuant software (Bio-Rad) in at least quadruplated experiments. Nuclear and cytoplasmic extracts were separated by using extraction kit (Thermo Scientific). Tubulin (Abcam) was used as cytoplasmic loading control or actin (Sigma Aldrich) as total cell lysate control.

To co-immunoprecipitate total cell lysates were isolated from primary MΦ, immunoprecipitated with FLNA^{CT} antibody and then immunoblotted against STAT3 according to manufacturer's protocol (Thermo Scientific).

To assay MΦ for proliferation, the cells were seeded in 6 well plates and cultured up to 6 days as described earlier.¹³ To assay MΦ for migration, the cells were incubated for 12

hours using Boyden chambers with a microporous nitrocellulose filter (8 μm thick, 8 μm pores in diameter) as described earlier.¹²

Secreted levels of IL-6, IL-10 and IL-12 were detected by ELISA (eBioscience) from either mouse serum or M Φ as described earlier.⁶ Before experiments with ELISA, immunoblotting, proliferation, migration lipid uptake assays, murine M Φ were treated with calpain inhibitor calpeptin (Sigma Aldrich) at a concentration of 80 μM and STAT3 inhibitor DPP 5,15 (Sigma Aldrich) at a concentration of 60 μM .

Mouse model of atherosclerosis using bone marrow transplantation

Bone marrow was isolated from 10-12 weeks old *Flna*^{o/fl}/LC and control *Flna*^{o/fl} control mice. Four hours after irradiation by 9.5 Gy lethal dose, 12 weeks old *ldlr*^{-/-} mice received bone marrow transplantation (BMT) as described earlier.¹⁴ Mice that received BMT were fed with Western diet containing 1.25% of cholesterol for 25 weeks. Aortas were then isolated to iliac bifurcation, fixed with 4% formaldehyde, pinned out under inverted microscope and stained with Sudan IV as described earlier.¹⁴ Paraffin-embedded mouse aortas were sectioned and immunofluorescently stained with antibodies against FLNA (Chemicon International), CD31 (Thermo Scientific), SM22 α (Dako) and CD68 (Dako) on the same section as described earlier.¹⁵ Pinned aortas and aortic histological images were captured by Leica Microsystems microscope and quantified by using Biopix software as described earlier.⁶

Mouse model of atherosclerosis by adenoviral infection with AdPCK9

To induce atherogenesis, 8-10 weeks old *Flna*^{fl/fl} or *Flna*^{o/fl}/LC mice were infected with adenoviral vector overexpressing proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCK9) at a dose of 2×10^{11} viral particles/mouse as described earlier.¹⁶ These mice were then fed with high fat diet for 20 weeks and aortas were analysed as described above.

For calpeptin treatment, 8-10 weeks old C57BL/6 mice were infected with AdPCK9 as described above. These mice received a high-cholesterol diet for 20 weeks and treated with calpeptin by intraperitoneal injection during last 8 weeks (3 times/week). Calpeptin was first dissolved in DMSO and later diluted in saline at 1:1000 dilution (0.65 mg/kg per mouse) and same solution except that of calpeptin was administered as control.

Primary human macrophages

Human primary MΦ was isolated from peripheral donor blood as described earlier.¹⁷ These MΦ were cultured for 6 days and then transfected with siRNA *FLNA* (Mm01187533_m1). mRNA was isolated (RNeasy Mini Kit, Qiagen) and cDNA was synthesized (High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems) according to the manufacturer protocol. Gene expression was then analyzed by TaqMan assays with human probes for *FLNA* and *GAPDH*.

Lipid uptake assay

Primary human and murine MΦ were incubated with 50 μg/mL of minimally oxidized-LDL (mmLDL) to measure intracellular mmLDL foamed within 24 hours. In some experiments, total LDL and OxLDL were also Dil-labelled for 3 hours to assay lipid uptake and images were analyzed by using Biopix software as described earlier.⁶

Statistics

Two-tailed Student *t* test or 1-way ANOVA statistical analyses were performed by using GraphPad Prism 6 between the experimental groups. Quantitative results were reported as means ± SEMs. A *P* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Filamin A Expressed by Macrophages in Human Atherosclerotic Carotid Arteries

We observed that FLNA was expressed within human carotid arteries displaying atherosclerotic plaques. Co-localization studies indicated that FLNA expressed mainly by MΦ in advanced atherosclerotic plaques (Figure 1A, *right* lower panel). In addition, FLNA was also expressed by vascular smooth muscle cells (vsmc), particularly in the medial layer (Figure 1A, *left* lower panel). We observed an increased number of MΦ in advanced plaques as compared to intermediate plaques (8.5×10^5 pixels *versus* 1.8×10^4 pixels, $P < 0.05$, Figure 1B). In advanced atherosclerotic lesions, number of MΦ expressing FLNA was increased as compared to the MΦ that are present in intermediate lesions (0.19 *versus* 0.22 Manders overlap coefficient, $P < 0.05$, Figure 1C).

Macrophages Deficient for Filamin A (FlnA) Proliferate and Migrate Poorly

To determine the biological role of FLNA in MΦ, we produced mice that are deficient for *Flna*¹³ and extracted MΦ from these mice (*Flna*^{o/fl}LC). Mice that lack *Flna* in MΦ were fertile and did not show any phenotype as compared to controls expressing *Flna* (*Flna*^{o/fl}). To verify deficiency of *Flna* in MΦ, we extracted murine MΦ from bone marrow with or without *Flna* for immunoblotting (Figure 2A). MΦ without FLNA displayed rounded shape, whereas MΦ with FLNA were elongated as detected by immunofluorescence staining of actin phalloidin (Figure 2B). MΦ lacking FLNA proliferated less than MΦ expressing FLNA (Figure 2C). These differences reached significant differences at day 4 (6.1 ± 1.2 *versus* 3.8 ± 0.9 , $P < 0.05$) and day 5 (15.2 ± 3.2 *versus* 11.8 ± 2.4 , $P < 0.01$). In addition, MΦ lacking FLNA were migrated less than MΦ expressing FLNA (by 58%, $P < 0.01$, Figure 2D). As compared to the MΦ expressing FLNA, MΦ lacking FLNA expressed lower levels of phosphorylated AKT (pAKT) (by 40%, $P < 0.05$, Figure 2E) and ERK1/2 (p-ERK1/2) (by 62%, $P < 0.05$, Figure 2F).

Deficiency of Filamin A in Macrophages Leads to Smaller Size of Atherosclerotic Plaques

To determine biological importance of FLNA in MΦ during atherogenesis, we transplanted bone marrow (BMT) from *Flna^{o/fl}* or *Flna^{o/fl}/LC* mice to atherogenic *ldlr^{-/-}* mice and observed a significant reduction in atherosclerotic plaque size in *ldlr^{-/-}* mice received BMT from *Flna^{o/fl}/LC* mice (*ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}/LC*) by 55% ($P < 0.001$, Figure 3A) as compared with controls *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}*. Similarly, a significant reduction in ratio of intima/media was observed in of *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}* aortas by 39% ($P < 0.05$, Figure 3A). Localization studies in immunofluorescently stained histological sections indicated that majority of intimal cells within the atherosclerotic plaques in *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}* aortic arches was MΦ and there was almost no MΦ in *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches (Figure IA in the online-only Data Supplement). In another mouse model of atherosclerosis, we infected *Flna^{o/fl}* or *Flna^{o/fl}/LC* mice with an adenoviral vector (Ad) driving overexpression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCK9) and observed a significant reduction in plaque size in *Flna^{o/fl}/LC* aortas infected with AdPCK9 as compared with *Flna^{o/fl}* infected with AdPCK9 (by 66%, $P < 0.05$, Figure 3B). Number of CD68-positive MΦ in *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches infected with AdPCK9 by 41% ($P < 0.05$, Figure 3C) was reduced. However, there was no difference in the number of SM22 α -positive cells between the *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches (Figure IB in the online-only Data Supplement).

Deficiency of Filamin A in Macrophages Impairs Secretion of Inflammatory Cytokines

We have observed a significant reduction in IL-6 secretion by ELISA in cultured primary *Flna^{o/fl}/LC* MΦ as compared with *Flna^{o/fl}* controls (29045.3 ± 573.4 pg/ml versus, 16905.5 ± 386.5 pg/ml, $P < 0.05$, Figure 4A **left** panel). Similarly, serum levels of IL-6 was lower in *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}/LC* blood as compared to *ldlr^{-/-}* BMT: *Flna^{o/fl}* controls (202.9 ± 8.9 pg/ml versus 308.5 ± 45.4 pg/ml, $P < 0.05$, Figure 4A **right** panel). In contrast, secretion of pro-inflammatory cytokine IL-10 in primary cultured *Flna^{o/fl}/LC* MΦ was higher than in *Flna^{o/fl}* controls (358.5 ± 57.3 pg/ml versus 202.9 ± 8.9 pg/ml, $P < 0.01$, Figure 4B). Secretion of another inflammatory cytokine IL-12 was also reduced in primary cultured *Flna^{o/fl}/LC* MΦ compared with *Flna^{o/fl}* controls (3863.1 ± 205.8 pg/ml versus 525.7 ± 159.4 pg/ml, $P < 0.01$, Figure 4C).

C-terminal fragment of filamin A facilitates nuclear transportation of phosphorylated STAT3 and subsequently regulates release of IL-6.

We identified STAT3 as an interacting partner of CT-fragment of FLNA (FLNA^{CT}) by co-immunoprecipitation assay (Figure 5A). We separated nuclear and cytosolic extracts from LPS-stimulated MΦ and immunoblotted for p-STAT3^{Y705} to study its nuclear transportation. In *Flna*^{offl}/LC MΦ, level of nuclear p-STAT3^{Y705} was less than control *Flna*^{offl} MΦ (0.51 ± 0.19 versus 0.23 ± 0.06 , $P < 0.001$, Figure 5B). However, there was no difference in the cytosol between the *Flna*^{offl} and *Flna*^{offl}/LC MΦ (Figure 5B). Similarly, nuclear expression level of another site of STAT3 phosphorylation (p-STAT3^{S727}) was also less in *Flna*^{offl}/LC MΦ as compared to *Flna*^{offl} MΦ (Figure IIA in the online-only Data Supplement). Tubulin was served as cytosolic loading controls. Treatment of MΦ with calpain inhibitor calpeptin reduces production of FLNA^{CT} by 59% ($P < 0.01$, Figure 5B). Total level of phosphorylated STAT3^{Y705} was higher in *Flna*^{offl} MΦ compared to *Flna*^{offl}/LC MΦ (Figure 5C). Treatment of *Flna*^{offl} MΦ with calpeptin reduces nuclear expression of p-STAT3^{Y705} (0.55 ± 0.18 versus 0.13 ± 0.04 , $P < 0.01$, Figure 5D) to the similar level of nuclear expression observed in *Flna*^{offl}/LC MΦ. Similarly, treatment of *Flna*^{offl} MΦ with calpeptin reduced nuclear expression of p-STAT3^{S727} (Figure IIB in the online-only Data Supplement). As p-STAT3 binds to the promoter of IL-6 to subsequently induce secretion of IL-6, we studied secreted levels of IL-6 by ELISA and observed that treatment of *Flna*^{offl} MΦ with calpeptin reduces levels of IL-6 (1.05 ± 0.05 versus 0.19 ± 0.02 , $P < 0.01$, Figure 5E). Similarly, treatment of these cells with STAT3 inhibitor 5,15 DPP reduces secretion of IL-6 (1.05 ± 0.05 versus 0.60 ± 0.03 , $P < 0.01$, Figure 5E) to the similar level observed in *Flna*^{offl}/LC MΦ. Compared with *Flna*^{offl} controls, treatment with calpeptin increased secretion of IL-10 in primary cultured *Flna*^{offl}/LC MΦ (from 201.69 ± 54.51 pg/ml to 291.28 ± 49.04 pg/ml) (Figure IIIA in the online-only Data Supplement) and reduced secretion of IL-12 (from 4200 ± 231.85 pg/ml to 335 ± 18.21 pg/ml, $P < 0.01$) (Figure IIIB in the online-only Data Supplement).

Filamin A Deficiency in Macrophages Leads to Impaired Lipid Uptake.

We silenced expression of *FLNA* in human primary MΦ by siRNA *FLNA* ($P < 0.01$, Figure 6A *left* graph) and observed a reduced minimally modified lipids (mmLDL) by 52% in these MΦ ($P < 0.05$, Figure 6A *right* graph). We analysed lipid profile in peripheral blood from *Flna*^{offl} and

Flna^{off}/LC mice by lipid chromatography. The higher plasma lipid levels, particularly in VLDL fraction, were evident in *Flna^{off}/LC* when the plasma lipoproteins were fractionated by fast protein liquid chromatography. (Figure 6B). Similar to the human MΦ, *Flna^{off}/LC* MΦ displayed lower levels of oxidized lipid by 68% as compared to *Flna^{off}* MΦ ($P<0.01$, Figure 6C). Following treatment with calpeptin, higher levels of mmLDL in *Flna^{off}* MΦ reduced to the levels observed in *Flna^{off}/LC* MΦ by 63% ($P<0.05$, Figure 6C). Similarly, treatment of these MΦ with 5,15 DPP reduced levels of mmLDL in *Flna^{off}* MΦ ($P<0.05$, Figure 6C). We then assayed these MΦ for lipid uptake and observed that *Flna^{off}/LC* MΦ have impaired uptake of both total LDL and oxidized-LDL (OxLDL) by 52% and 41%, respectively as compared to *Flna^{off}* MΦ ($P<0.01$, Figure 6D). Following treatment with calpeptin, higher levels of total LDL and OxLDL uptake in *Flna^{off}* MΦ reduced to the levels observed in *Flna^{off}/LC* MΦ by 79% and 82%, respectively ($P<0.01$, Figure 6D). We immunoblotted proteins that are involved in lipid metabolism and observed increased levels of CD36 (54%, $P<0.01$), COX2 (106%, $P<0.001$), and SRB1 (31%, $P<0.05$) in *Flna^{off}* MΦ as compared to *Flna^{off}/LC* MΦ (Figure 6E). However, differences in LXR α , ABCG1, and ABCA1 did not reach a statistical significances.

Calpeptin Reduces Formation of Aortic Atherosclerotic Plaque.

Treatment with calpeptin was inhibited proliferation of MΦ and this inhibition reached a statistical significance at day 3 (3.32 ± 3.5 fold *versus* 1.01 ± 0.8 fold, $P<0.05$, Figure 7A) and continued until the end of proliferation assay. In addition, migration of MΦ was reduced by 27% after treatment with calpeptin ($P<0.05$, Figure 7B). Levels of p-AKT were reduced in *Flna^{off}* MΦ by 55% ($P<0.05$, Figure IVA in the online-only Data Supplement). Levels of p-ERK1/2 were also reduced in these MΦ by 26%, but did not reach a statistical significance (Figure IVB in the online-only Data Supplement). To study these inhibitory effects of calpeptin on MΦ proliferation and migration *in vivo*, we infected control mice with AdPCSK9. These mice were fed with high-cholesterol diet for 20 weeks and treated with calpeptin last 8 weeks. Following treatment with calpeptin, formation of aortic plaque size reduced by 49% ($P<0.05$, Figure 7C). Image analysis of histological sections was demonstrated a reduced ratio of intima/media by 56% ($P<0.01$, Figure 7D). Number of MΦ within the atherosclerotic plaques was reduced by 42% after treatment with calpeptin ($P<0.05$, Figure 7E).

DISCUSSION

This study is the first to show that deletion or knockdown of FLNA expression in macrophages *in vivo* inhibits aortic plaque development in atherogenic *ldlr*^{-/-} mice and mice infected with AdPCSK9. In macrophages, cellular migration, proliferation, secretion of interleukins and lipid uptake are key events during the development of atherosclerosis.⁴ In the absence of FLNA, macrophages displayed impaired migration and proliferation by decreased levels of AKT and ERK1/2. These macrophages secreted decreased levels of IL-6 that is partly regulated by STAT3 that physically interacts with cleaved fragment of FLNA by calpain. Inhibition of this cleavage by chemical inhibitor calpeptin reduced aortic plaque formation in atherogenic mice. These mechanisms not only provide an evident link between the biological role of FLNA and atherogenesis but also identifies a specific proteolytic target that modifies atherosclerotic plaque formation.

Macrophage proliferation and migration was reduced in the absence of FLNA and these macrophages displayed impaired AKT and ERK signaling. In addition, we observed less number of macrophages in atherosclerotic plaques in the absence of FLNA. Similar to macrophages, vascular endothelial cells¹⁸ and human melanoma cells¹³ express lower levels of AKT in the absence of FLNA. FLNA controls monocyte migration by regulating actin dynamics via Rho GTPases⁵ and FLNA phosphorylation by AKT promotes cell migration¹⁹. Furthermore, AKT deficiency in macrophages reduces the progression of atherosclerosis in *ldlr*^{-/-} mice²⁰ and *Akt2*^{-/-} macrophages display reduced migration, inflammatory response to proatherogenic cytokines and cholesterol metabolism *in vitro*²¹. Similar to AKT, ERK signaling is also necessary in the cytokine-mediated changes in macrophage cholesterol homeostasis and gene expression during atherosclerosis.¹⁹ Our study demonstrated lower levels of ERK in macrophages deficient for FLNA.

Macrophages secrete multiple pro- as well as anti-inflammatory cytokines. We observed decreased levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12 in macrophages deficient for FLNA. IL-6 is expressed by macrophages in atherosclerotic *apoE*^{-/-} aortas²² and anti-IL-6 therapy using an IL-6 receptor antibody prevents atherogenesis in *ldlr*^{-/-} mice²³. IL-6

expression is regulated by the phosphorylated STAT3.²⁴ Here, we have shown that STAT3 binds to FLNA^{CT} cleaved by calpain. Lack of FLN^{CT} decreased nuclear expression of STAT3 and then secretion of IL-6. Calpain inhibition reduces development of abdominal aortic aneurysm formation and atherosclerosis in *ldlr*^{-/-} mice.²⁵ We treated macrophages with calpeptin and observed reduced nuclear expression of STAT3 and IL-6 production. This *in vitro* result supported by the systemic administration of calpeptin to treat aortic atherogenesis in mice that displayed reduced size of atherosclerotic plaques.

The finding of reduced atherosclerosis in macrophage-specific *Flna*-deficient mice is likely explained by three factors. First, foam cell formation in *Flna*-deficient macrophages was reduced. Second, the signaling pathway that led to increased cholesterol efflux of *Flna*-deficient macrophages was associated with increased expression of SR-B1, CD36, and COX2.²⁶ Third, plasma lipid levels were higher in *Flna*-deficient mice. Each of these factors—less unloaded cholesterols by cultured macrophages, decreased macrophage reverse cholesterol transport, and higher plasma lipid levels *in vivo*—would be expected, on the basis of previous studies, to reduce atherogenesis. The finding that ABCA1 and ABCG1 were not involved in the cholesterol metabolism of *Flna*-deficient macrophages was surprising because those transporters are considered crucial for the unloading of cholesterol from macrophages. However, SR-B1 and CD36 contributed to macrophage cholesterol efflux in previous studies, and our present experiments provide strong evidence for their contribution to efflux of *Flna*-deficient macrophages. In macrophages, calpains induce proteolytic degradation of ATP-binding cassette transporters, ABCA1 and ABCG1, which results in impaired cholesterol efflux and subsequent macrophage foam cell formation.²⁷ Furthermore, calpains facilitate the CD36-dependent uptake of LDL, and block cholesterol efflux through ABCA1 and ABCG1 in lesional macrophages, allowing the expansion of lipid-enriched atherosclerotic plaques.²⁸ Blocking cleavage of FLNA by calpain reduced lipid uptake to similar reduced levels observed in *Flna*-deficient macrophages. Furthermore, atherosclerotic plaque size induced by the infection with AdPCSK9 reduced following treatment with calpeptin. Thus, this study identifies FLNA as one of the substrates proteolyzed by calpains, regulating lipid metabolism in macrophages during atherogenesis.

Overall, we have established a causative correlation between FLNA signaling and atherogenesis *in vivo* and identified FLNA cleavage in macrophages as a potential target to inhibit atherosclerosis. The identification of increased FLNA expression in macrophages in human patients with carotid artery plaques suggests that expression of FLNA might be a prognostic biomarker for atherosclerosis, and the chemical agents that prevent FLNA cleavage may have therapeutic potential for atherosclerosis and other cardiovascular disorders.



FIGURE LEGENDS

Figure 1. Filamin A is expressed by macrophages in human atherosclerotic carotid arteries.

A, Hematoxylin & eosin-stained sections of intermediate and advanced atherosclerotic lesions in human endarterectomies (upper panels). Immunofluorescence detection of macrophages (MΦ), filamin A (FLNA), vascular smooth muscle cells (SMC), endothelial cells (EC) in intermediate (n = 8) and advanced (n = 9) atherosclerotic human plaques (lower panels). Nuclear staining by DAPI. Arrowhead points internal elastic lamina bordering intimal thickening from medial layer. **B**, Number of MΦ in advanced lesions as compared to intermediate lesions. **C**, Expression of FLNA by MΦ in advanced and intermediate lesions. Mean ± SEM values. * $P < 0.05$.

Figure 2. Macrophages deficient for filamin A proliferate and migrate poorly.

A, Immunoblot analysis of FLNA in MΦ extracted either from male mice either expressing *Flna* (*Flna^{offl}* controls) or lacking *Flna* (*Flna^{offl}/LC*). MΦ-specific expression driven by lysosome promoter (LC). Actin was included as internal loading controls. **B**, Morphological shape of MΦ expressing *Flna* (*Flna^{offl}*) or lacking *Flna* (*Flna^{offl}/LC*) as detected by immunofluorescence actin staining. **C**, Number of *Flna^{offl}/LC* and *Flna^{offl}* MΦ as assayed for cellular proliferation up to 5 days. **D**, Number of *Flna^{offl}/LC* and *Flna^{offl}* MΦ as assayed for cellular migration up to 8 hours. Phosphorylated level of p-AKT (**E**) and p-ERK (**F**) proteins as detected by immunoblotting. Total AKT and total ERK were used as loading controls. Mean ± SEM values of at least quadruplicated data. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Figure 3. Mice lacking filamin A in macrophages develop smaller aortic atherosclerotic plaques.

A, Sudan IV-stained atherosclerotic aortic plaques obtained from mice that are deficient for low-density lipoprotein receptor (*ldlr^{-/-}*) and received bone marrow transplantation (BMT) from *Flna^{offl}/LC* mice that are deficient for FLNA in MΦ (n = 15) as compared to *ldlr^{-/-}* mice that received BMT from *Flna^{offl}* mice expressing *Flna* (n = 12) (**left** panels). Quantification of

atherosclerotic plaque size by image analysis in *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortas (**middle** graphs). Aortic intima/media ratios in *ldlr^{-/-}* mice received *Flna^{o/fl}/LC* BMT (**right** graphs). **B**, Sudan IV-stained atherosclerotic aortic plaques obtained from *Flna^{o/fl}/LC* mice infected with adenoviral vector driving overexpression of PSCK9 (AdPSCK9) (n = 13) as compared to *Flna^{o/fl}* controls infected with AdPSCK9 (n = 9) (**left** panels). Quantification of atherosclerotic plaque size by image analysis in *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortas infected with AdPSCK9 (**middle** graphs). Aortic intima/media ratios in *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches from mice infected with AdPSCK9 (**right** graphs). **C**, Immunofluorescent detection of CD68 in *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches (**left** panels). Number of CD68-positive MΦ in *Flna^{o/fl}* and *Flna^{o/fl}/LC* aortic arches from mice infected with AdPSCK9 (**right** graphs). Arrowheads point internal elastic lamina bordering intimal thickening from tunica media. Mean ± SEM values. **P*<0.05 and ****P*<0.001.

Figure 4. Secretion of Inflammatory Cytokines Impaired in Macrophages Deficient for Filamin A.

A, Secretion of IL-6 in primary MΦ either expressing *Flna* (*Flna^{o/fl}*) or lacking *Flna* (*Flna^{o/fl}/LC*) as detected by ELISA (n = 8 in each). Serum blood level of secreted IL-6 in atherogenic low-density lipoprotein receptor-deficient mice (*ldlr^{-/-}*) that received bone marrow transplantation (BMT) either from *Flna^{o/fl}/LC* mice or *ldlr^{-/-}* mice that received BMT from *Flna^{o/fl}* mice (n = 6 in each). Secretion of IL-10 (**B**) and IL-12 (**C**) in primary *Flna^{o/fl}* or *Flna^{o/fl}/LC* MΦ as detected by ELISA (n = 8 in each). Mean ± SEM values. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure 5. C-terminal fragment of filamin A produced by calpain interacts with phosphorylated STAT3 and facilitates nuclear transportation of STAT3 to subsequently regulate secretion of IL-6.

A, Co-immunoprecipitation identifying STAT3 as an interacting partner of C-terminal fragment filamin A (FLNA^{CT}). **B**, Quantification of immunoblots demonstrating expression of p-STAT3^{Y705} in cytosol (C) and nucleus (N) in lipopolysaccharide-treated MΦ deficient for FLNA (*Flna^{o/fl}/LC*) and expressing FLNA (*Flna^{o/fl}/LC*). **C**, Quantification of immunoblots demonstrating FLNA expression after treatment with calpeptin, a calpain inhibitor. ACTIN was

served as internal loading control. **D**, Quantification of immunoblots demonstrating nuclear expression of p-STAT3^{Y705} in *Flna*^{o/fl} and *Flna*^{o/fl}/LC MΦ following treatment with calpeptin. **E**, Secretion of pro-inflammatory IL-6 as detected by ELISA following treatment with calpeptin and STAT3 inhibitor 5,15 DPP in *Flna*^{o/fl} and *Flna*^{o/fl}/LC MΦ. Mean ± SEM values of at least quadruplicated experiments. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure 6. Lacking of filamin A impairs uptake of oxidized lipids in macrophages.

A, Expression of mRNA *FLNA* in human primary MΦ transfected with siRNA *FLNA*. Scrambled siRNA (siRNA Φ) were served as controls. GAPDH mRNA was used to normalize ratios (*left* panel). Level of minimally modified low density lipoprotein (mmLDL) in human primary MΦ transfected with siRNA Φ or siRNA *FLNA* (*right* panel). **B**, Cholesterol and triglyceride levels in fast protein liquid chromatography–fractionated plasma pooled from 6 *ldlr*^{-/-} mice received bone marrow transplantation (BMT) from *Flna*^{o/fl}/LC mice for as compared to mice received BMT from *Flna*^{o/fl} mice in each after a high-fat diet for 24 weeks. HDL indicates high-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; and VLDL, very-low-density lipoprotein. **C**, Levels of mmLDL in murine *Flna*^{o/fl} and *Flna*^{o/fl}/LC MΦ after treatment with calpain inhibitor calpeptin and STAT3 inhibitor 5,15 DPP. **D**, Uptake of total LDL (*left graphs*) and OxLDL (*right graphs*) in *FlnA*^{o/fl} and *FlnA*^{o/fl}/LC MΦ after treatment with calpain inhibitor calpeptin. **E**, Quantification of immunoblots of SR-B1, LXRα/β, CD36, COX2, ABCG1, ABCA1 proteins extracted from *Flna*^{o/fl} and *Flna*^{o/fl}/LC MΦ. Mean ± SEM values of quadruplicated data. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure 7. Calpeptin reduces proliferation and migration of macrophages *in vitro* and aortic atherosclerotic plaque size *in vivo*.

A, Proliferation assay of MΦ treated with calpeptin up to 5 days. **B**, Migration assay of MΦ for 16 hours. **C**, Images of Sudan IV-stained–aortas extirpated from C57BL/6 mice infected with AdPCSK9 and treated without (n = 8) or with calpeptin (n = 9) (*left* panels) and their quantification by image analysis (*right graphs*). **D**, Hematoxylin and Eosin-stained sections of C57BL/6 aortic arches infected with AdPCSK9 and treated without or with calpeptin (*left* panels). Histomorphological analysis of aortic intima/media ratios of C57BL/6 mice infected

with AdPCSK9 and treated without (n = 7) or with (n = 9) calpeptin (*right* graphs). **E**, Number of CD68-positive MΦ in aortas of C57BL/6 mice infected with AdPCSK9 and treated without (n = 7) or with (n = 9) calpeptin. Mean ± SEM values of at least quadruplicated experiments. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Liliana Håversen, Elin Stenfeldt, and Kristina Skålen (The Wallenberg Laboratory, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden) for excellent technical help and Rosie Perkins for editing the manuscript.

SOURCE OF FUNDING

Work in the authors' laboratories is supported by the Strategic Fund from Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, the Swedish Cancer Foundation (Contract number 17 0171) and the ALF fund (ALFGGBG-495961) by the Sahlgrenska Academy Hospital at the Västra Götalandsregionen.

DISCLOSURES

None.

AFFILIATIONS

Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden (S.B., R.S., C.A., S.D., J.K., L.M.A.). Sahlgrenska Cancer Center, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden (M.K.A., M.O.B.). Cardiovascular and Metabolic Research Center, University of Gothenburg, Gothenburg, Göteborg, Sweden (M.E., M.L., J.B.). Department of Clinical Pathology and Genetics, Sahlgrenska Academy Hospital, Göteborg, Sweden (L.M.A.).

DATA SUPPLEMENT FIGURE LEGENDS

Figure I Data Supplement. Deficiency of filamin A in macrophages decreases number of macrophages in atherosclerotic aortic plaques, but does not change number of smooth muscle cells.

A, Immunofluorescence detection of MΦ, filamin A (FLNA), vascular smooth muscle cells (SMC), endothelial cells (EC) in mice that are deficient for low-density lipoprotein receptor (*ldlr*^{-/-}) and received bone marrow transplantation (BMT) from *Flna*^{offl}/LC mice that are deficient for filamin A in MΦ (n = 4) as compared to *ldlr*^{-/-} mice that received BMT from *Flna*^{offl} mice expressing *Flna* (n = 4). Nuclear staining by DAPI. Note absence of macrophages in atherosclerotic plaque (right panel). **B**, No significant change in number of SM22⁺-positive vascular smooth cells in *ldlr*^{-/-} mice received either *Flna*^{offl} or *Flna*^{offl}/LC BMT. Mean ± SEM values.

Figure II Data Supplement. Reduced nuclear expression of p-STAT3^{S727} in the absence of filamin A in macrophages.

A, Reduced nuclear transportation of phosphorylated STAT3 (p-STAT3^{S727}) in lipopolysaccharide-treated MΦ deficient for *Flna* (*Flna*^{offl}/LC) as compared to MΦ expressing *Flna* (*Flna*^{offl}). C; cytosolic protein extract and N; nuclear extract. **B**, Inhibition of cleavage of FLNA by calpeptin reduces nuclear transportation of p-STAT3^{S727} in *Flna*^{offl} MΦ as quantified of immunoblots. Mean ± SEM values of at least quadruplicated experiments. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure III Data Supplement. Cleavage of filamin A regulates secretion of interleukins in macrophages.

Inhibition of cleavage of FLNA by calpeptin reduces secretion of anti-inflammatory IL-10 (**A**) and pro-inflammatory IL-12 (**B**) in *Flna*^{offl} MΦ as detected by ELISA. Mean ± SEM values of at least quadruplicated experiments. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure IV Data Supplement. Inhibition of cleavage of calpain reduces levels of phosphorylated AKT and ERK1/2.

Treatment of MΦ by calpeptin decreases level of p-AKT (**A**) and p-ERK (**B**) proteins in MΦ as detected by immunoblotting. Total AKT and total ERK1/2 were used as loading controls. Mean ± SEM values of quadruplicated data. * $P < 0.05$.

Figure V Data Supplement. Association of gene expression of *FLNA*, *STAT3*, and *IL6* in public datasets.

A, Increased gene expression of *FLNA*, *STAT3*, and *IL6* in human brain cortex during either normoxia or ischemia. Reads were downloaded from the European Nucleotide Sequence archive accession PRJNA242801 and aligned to the hg19 reference genome with STAR v (GSE56267). 2.5.2,²⁹ with splice junctions supplied from the GENCODE v17 reference genome annotation (otherwise default parameters). Gene expression levels were quantified with HTSeq v. 0.6.0 (specifying the parameter “-s reverse”).³⁰ DESeq2 and limma tests were used for differential expression, respectively, relative to the control conditions. **B**, Comparison of *Flna*, *STAT3*, and *IL6* gene expression in *ApoE*^{-/-} murine aortic plaques with *wild-type* C57BL/6J adventitia and media. Note that *Flna* gene is expressed in atherosclerotic plaques more than *wild-type* adventitia. Increased *Flna* gene expression in *apoE*^{-/-} plaques compared to wild-type medial and adventitial layers. Raw CEL files were downloaded from the ArrayExpress accession and normalized using the “rma” function of the “oligo” R package (v. 1.40.2, default settings) (E-GEOD-21419).³¹ The quality of the normalization was assessed using the arrayQualityMetrics R package (v. 3.32.0).³² Differential expression analysis was performed with the “eBayes” function of the limma R package (v. 3.32), using default settings.³³ * $P < 0.05$.

REFERENCES

1. Zheng X, Zhou AX, Rouhi P, Uramoto H, Boren J, Cao Y, Pereira T, Akyurek LM and Poellinger L. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:2560-5.
2. Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwrick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO and Group OP-sDCC. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet*. 2003;33:487-91.
3. Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ and Walsh CA. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:19836-41.
4. Li AC and Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002;8:1235-42.
5. Leung R, Wang Y, Cuddy K, Sun C, Magalhaes J, Grynopas M and Glogauer M. Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1077-91.
6. Khan OM, Akula MK, Skalen K, Karlsson C, Stahlman M, Young SG, Boren J and Bergo MO. Targeting GGTase-I activates RHOA, increases macrophage reverse cholesterol transport, and reduces atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2013;127:782-90.
7. Dissmore T, Seye CI, Medeiros DM, Weisman GA, Bardford B and Mamedova L. The P2Y2 receptor mediates uptake of matrix-retained and aggregated low density lipoprotein in primary vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2016;252:128-35.
8. Zhou AX, Hartwig JH and Akyurek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol*. 2010;20:113-23.
9. Ekstrand M, Widell E, Hammar A, Akyurek LM, Johansson M, Fagerberg B, Bergstrom G, Levin MC, Fogelstrand P, Boren J and Levin M. Depletion of ATP and glucose in advanced human atherosclerotic plaques. *PLoS One*. 2017;12:e0178877.
10. Feng YY, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ and Walsh CA. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:19836-19841.
11. Bandaru S, Gronros J, Redfors B, Cil C, Pazooki D, Salimi R, Larsson E, Zhou AX, Omerovic E and Akyurek LM. Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2015;105:151-159.

12. Bandaru S, Zhou AX, Rouhi P, Zhang Y, Bergo MO, Cao Y and Akyurek LM. Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis*. 2014;3.
13. Nallapalli RK, Ibrahim MX, Zhou AX, Bandaru S, Sunkara SN, Redfors B, Pazooki D, Zhang Y, Boren J, Cao Y, Bergo MO and Akyurek LM. Targeting filamin A reduces K-RAS-induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice. *Mol Cancer*. 2012;11:50.
14. Sayin VI, Khan OM, Pehlivanoglu LE, Staffas A, Ibrahim MX, Asplund A, Agren P, Nilton A, Bergstrom G, Bergo MO, Boren J and Lindahl P. Loss of One Copy of Zfp148 Reduces Lesional Macrophage Proliferation and Atherosclerosis in Mice by Activating p53. *Circulation Research*. 2014;115:781-U91.
15. Ekstrand M, Widell E, Hammar A, Akyurek LM, Johansson M, Fagerberg B, Bergstrom G, Levin MC, Fogelstrand P, Boren J and Levin M. Depletion of ATP and glucose in advanced human atherosclerotic plaques. *Plos One*. 2017;12.
16. Bjorklund MM, Hollensen AK, Hagensen MK, Dagnaes-Hansen F, Christoffersen C, Mikkelsen JG and Bentzon JF. Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering. *Circulation Research*. 2014;114:1684-+.
17. Lundqvist A, Magnusson LU, Ullstrom C, Krasilnikova J, Telysheva G, Dizhbite T and Hulten LM. Oregonin reduces lipid accumulation and proinflammatory responses in primary human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458:693-9.
18. Bandaru S, Gronros J, Redfors B, Cil C, Pazooki D, Salimi R, Larsson E, Zhou AX, Omerovic E and Akyurek LM. Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2015;105:151-9.
19. Li L, Lu Y, Stemmer PM and Chen F. Filamin A phosphorylation by Akt promotes cell migration in response to arsenic. *Oncotarget*. 2015;6:12009-19.
20. Babaev VR, Hebron KE, Wiese CB, Toth CL, Ding L, Zhang Y, May JM, Fazio S, Vickers KC and Linton MF. Macrophage deficiency of Akt2 reduces atherosclerosis in Ldlr null mice. *J Lipid Res*. 2014;55:2296-308.
21. Rotllan N, Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Wanschel AC, Aryal B, Aranda JF, Goedeke L, Salerno AG, Ramirez CM, Sessa WC, Suarez Y and Fernandez-Hernando C. Hematopoietic Akt2 deficiency attenuates the progression of atherosclerosis. *FASEB J*. 2015;29:597-610.
22. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DelVecchio V, Halks-Miller M and Rubanyi GM. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1498-505.
23. Akita K, Isoda K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Kitamura K, Ohtomo F, Shimada K and Daida H. An Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Atherosclerosis in Atherogenic Mice. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:84.

24. Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP, Yu H, Jove R and Sotomayor EM. A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*. 2003;19:425-36.
25. Subramanian V, Uchida HA, Ijaz T, Moorleghen JJ, Howatt DA and Balakrishnan A. Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59:66-76.
26. Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*. 2008;263:256-73.
27. Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR and Miyazaki A. Calpain and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:228-37.
28. Miyazaki T and Miyazaki A. Emerging roles of calpain proteolytic systems in macrophage cholesterol handling. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:3011-3021.
29. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15-21.
30. Anders S, Pyl PT and Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166-9.
31. Carvalho BS and Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. 2010;26:2363-7.
32. Kauffmann A, Gentleman R and Huber W. arrayQualityMetrics--a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics*. 2009;25:415-6.
33. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W and Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.



Deficiency of filamin A in endothelial cells impairs left ventricular remodelling after myocardial infarction

Sashidar Bandaru¹, Julia Grönros^{2†}, Björn Redfors^{3,4†}, Çağlar Çil¹, David Pazooki⁵, Reza Salimi¹, Erik Larsson¹, Alex-Xianghua Zhou³, Elmira Ömerovic^{3,4}, and Levent M. Akyürek^{1,6*}

¹Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, Medicinaregatan 9A, SE-405 30 Gothenburg, Sweden; ²AstraZeneca, Mölndal, Sweden; ³Cardiovascular and Metabolic Research Center, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; ⁴Department of Cardiology, Sahlgrenska Academy Hospital, Gothenburg, Sweden; ⁵Department of Surgery, Sahlgrenska Academy Hospital, Gothenburg, Sweden; and ⁶Department of Clinical Pathology and Genetics, Sahlgrenska Academy Hospital, Gothenburg, Sweden

Received 27 February 2014; revised 2 October 2014; accepted 9 October 2014; online publish ahead of print 24 October 2014

Time for primary review: 22 days

Aims	Actin-binding protein filamin A (FLNA) regulates signal transduction important for cell locomotion, but the role of FLNA after myocardial infarction (MI) has not been explored. The main purpose of this study was to determine the impact of endothelial deletion of FLNA on post-MI remodelling of the left ventricle (LV).
Methods and results	We found that FLNA is expressed in human and mouse endothelial cells (ECs) during MI. To determine the biological significance of endothelial expression of FLNA, we used mice that are deficient for endothelial FLNA by cross-breeding adult mice expressing floxed <i>Flna</i> (<i>Flna^{fl/fl}</i>) with mice expressing Cre under the vascular endothelial-specific cadherin promoter (<i>VECadCre+</i>). Male <i>Flna^{fl/fl}</i> and <i>Flna^{fl/fl}/VECadCre+</i> mice were subjected to permanent coronary artery ligation to induce MI. <i>Flna^{fl/fl}/VECadCre+</i> mice that were deficient for endothelial FLNA exhibited larger and thinner LV with impaired cardiac function as well as elevated plasma levels of NT-proBNP and decreased secretion of VEGF-A. The number of capillary structures within the infarcted areas was reduced in <i>Flna^{fl/fl}/VECadCre+</i> hearts. ECs silenced for <i>Flna</i> mRNA expression exhibited impaired tubular formation and migration, secreted less VEGF-A, and produced lower levels of phosphorylated AKT and ERK1/2 as well as active RAC1.
Conclusion	Deletion of FLNA in ECs aggravated MI-induced LV dysfunction and cardiac failure as a result of defective endothelial response and increased scar formation by impaired endothelial function and signalling.
Keywords	Actin-binding protein • Angiogenesis • Cell migration • Heart

1. Introduction

After myocardial infarction (MI), the left ventricle (LV) undergoes molecular, cellular, and microcirculatory changes that dramatically alter the size, shape, and function at the organ level. Recent advances in our understanding of the control mechanisms regulating the development of new blood vessels in coronary heart disease have led to a better understanding of this essential compensatory healing process that accompanies myocardial ischaemia and infarction.¹ Angiogenesis executed by vascular endothelial cells (ECs) has the potential to salvage the ischaemic myocardium at early stages after MI and is also essential to prevent the transition to heart failure through the control of cardiomyocyte hypertrophy and contractility. Pro-angiogenic therapy has long been considered a promising strategy for the treatment of patients with

acute MI. Despite the tremendous efforts on hypoxia-stimulated angiogenesis, an established curative treatment is lacking. Therefore, a comprehensive understanding of the endothelial responses in angiogenesis and identification of new molecules targeting the vascular endothelium are essential in developing therapies to prevent and treat MI.

Filamins are a family of cytoskeletal proteins that have been implicated as critical mediators of organ development and cell signalling and migration.² FLNA, a major isoform of the filamin family, is ubiquitously expressed and is indispensable for normal development. Null mutations in FLNA have been reported to cause brain malformations known as periventricular nodular heterotopia accompanied by high cardiovascular abnormalities including patent ductus arteriosus, aortic aneurysms, premature strokes, and minor cardiovascular abnormalities in humans who

* Corresponding author. Tel: +46 31 7863456; fax: +46 31 416108; Email: leventakyurek@gu.se

† These authors contributed equally to this work.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

die prenatally.³ In mice, loss of *Flna* is associated with embryonic lethality caused by cardiac defects in the formation of ventricles, atria, and outflow tracts. The evident outcome of FLNA deficiency on structural defects in the blood vessels and heart suggests that FLNA plays a key role in cardiovascular morphogenesis.⁴

Although expression of FLNA has previously been reported in vessels and in cultured ECs,⁵ the endothelial significance of FLNA expression has not been determined. Besides, no data on the expression of FLNA have been reported in a remodelling myocardium in response to MI. To study the role of FLNA in vascular ECs during cardiovascular remodelling, we used mice that are deficient for FLNA in ECs and induced MI by ligation of the left descending coronary artery. Using this mouse model, we demonstrate that infarcted hearts lacking FLNA in ECs exhibit impaired cardiac function and developed severe cardiac failure. In addition, we show a key role of FLNA in EC tube formation and motility, exerted through its function as an interacting protein affecting signalling proteins.

2. Methods

2.1 Mice

All mice included in this study had a C57Bl/6 genetic background. Female mice⁶ expressing *Flna*^{fl/fl} were cross-bred with transgenic male mice expressing Cre under the control of the EC-specific *VE-Cadherin* promoter (*VE-CadCre+*, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Because the *Flna* gene is located on the X chromosome, male mice were hemizygous (*Flna*^{fl}). Two experimental groups, *Flna*^{fl/fl} and *Flna*^{fl/fl}*VE-CadCre+*, were included in this study. Mouse experiments were approved by the Research Animal Ethics Committee in Gothenburg according to the European Commission guidelines. For mouse genotyping, the *Flna*^{fl} allele was amplified as described earlier.⁶

2.2 MI surgery

Control *Flna*^{fl/fl} ($n = 15$) and experimental *Flna*^{fl/fl}*VE-CadCre+* ($n = 15$) male mice aged 13–14 weeks were used for induction of MI by permanent ligation of the left coronary artery as described previously.⁷ Coronary artery ligation was performed under inhalation of 3% isoflurane supplemented with 30% O₂. To recover mice after surgery, buprenorphine (0.05 mg/kg) was administered intraperitoneally.

2.3 Immunostaining

Paraffin-embedded infarcted human and mouse hearts were sectioned and immunohistochemically stained with an antibody against FLNA (Chemicon International), FLNB (Chemicon), and FLNC (Kinasource) as described previously.⁸ Antibodies directed against CD31 (Thermo Scientific) and Ki67 (Thermo Scientific) were used to detect cardiac ECs and replicating cells, respectively, as described earlier.⁷ For IF, secondary FITC-conjugated and Alexa conjugated antibodies (Molecular Probes, Sweden) were used. Images were captured using Leica Microsystems microscope. Number of CD31-positive structures in infarcted (entire area) and non-infarcted areas (5 randomly areas) was counted in at least seven mice in each group.

2.4 Echocardiography

Echocardiography was performed under anaesthesia by inhalation of 1.5–2% isoflurane (Forene isoflurane, Abbott Scandinavia AB, Sweden) as described earlier.⁷ Images were acquired using the Vevo660 system (Visual Sonics) with a 30 MHz linear transducer. The left ventricle was investigated in both long-axis and short-axis views 25 weeks after MI. Estimated ejection fraction (EF), an index of the cardiac systolic function was calculated as $EF = [(EDA - ESA)/EDA] \times 100$, where EDA and ESA representing end-diastolic and end-systolic LV luminal areas, respectively, measured in

high-resolution parasternal short-axis EKV acquired cine loops (1000 Hz) at the level of the papillary muscles and LV apex. For the stress test, dobutamine (1 µg/g mouse weight, Sigma Chemicals) was injected intraperitoneally. Short-axis cine loops at the papillary plane were stored at baseline, 5, and 10 min post dobutamine, and EF was calculated. Offline measurements were performed using the manufacturer's software (V3.0.0, Vevo770, Visual Sonics).

2.5 ELISA of NT-proBNP and VEGF-A

Following echocardiography, intracardiac blood was collected from *Flna*^{fl/fl} and *Flna*^{fl/fl}*VE-CadCre+* mice under inhalation of 2% isoflurane. NT-proBNP (My BioSource) and VEGF-A (R&D Biosystems) levels were detected by a standard ELISA according to the manufacturer's protocol from both mouse serum in independent quadruplicates, and conditioned medium collected from cell cultures of MS-1 and HUVEC cell lines, and measured by an Epoch spectrophotometer (Bio-Tek Instruments).

2.6 Histology and image analysis

Mouse chest was opened under anaesthesia by inhalation of 2% isoflurane immediately after echocardiography. Mouse hearts were arrested in diastole by intracardiac injection of 30 mM KCl, removed, embedded in paraffin, sectioned at six different levels at 0.5-mm intervals starting from the apex, and stained with Masson's trichrome or haematoxylin and eosin to study histomorphology. The diameter (average of longest and shortest axis), entire lumen, and thickness (average of longest and shortest thickness) of LV were measured by Biopix software (Version 2.3.2; Biopix, www.biopix.se). Images of Masson's trichrome-stained sections were processed using a Mirax scanner (Carl Zeiss) and digitized (TIFF format; with a resolution of 8 pixels/µm). Areas of blue (scar tissue) and red (non-infarcted) stain were quantified by Biopix software as described earlier.⁶ Infarct scar size was calculated by dividing the blue-coloured area by the sum of blue- and red-coloured areas. Images of immunohistochemically CD31-positive structures were printed in papers and manually counted in the entire infarcted areas.

2.7 Isolation and culture of ECs

Mice were killed under inhalation of 5% isoflurane, and mouse death was confirmed by dissecting hearts. Primary cardiac ECs were isolated using rat anti-ICAM2 (BD PharMingen) antibody-coated magnetic beads (Dynabeads M-450, sheep anti-Rat IgG, Dynal) from whole mouse hearts as described earlier.⁶ The transformed pancreatic endothelial MS1 cell line (ATCC) was cultured as described earlier.⁹ Human umbilical vein ECs (HUVECs) were cultured in basal medium supplemented with growth factors (EBM-2 bullet kit LONZA) as described earlier.⁷

2.8 Transfection with shRNA and siRNA

For shRNA transfection, MS1 cells were transfected with plasmids expressing either control shRNA or shRNA *Flna* (5'-GGAGTGCTATGTCACAGA AAT-3') (SABiosciences) using Fugene 6 (Promega) according to manufacturer's protocol 3 days before experiments. For siRNA transfection, MS1 cells and HUVECs were transfected with either negative control siRNA or siRNA *Flna* (5'-TACAGGCAATATGGTGAAGAA-3') (Qiagen) using Lipofectamin siMAX (Life technologies) following manufacturer's instructions 48 h before experiments.

2.9 Migration assay

Migration assay was performed on primary cardiac and MS1 ECs. Cell migration was quantified with a modified Boyden chamber assay where the ability of cells to migrate through a microporous nitrocellulose filter (8 µm thick, 8 µm pores in diameter) was measured as described earlier.⁶ Triplicates of each sample are presented as mean ± SD values.

2.10 Phalloidin staining

In triplicated independent experiments, MS1 cells transfected with either negative control (ø) or *Flna* siRNA were incubated in 4-well chamber slides for 24 h at 37°C with 5% CO₂. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature (RT), permeabilized for 30 min with PBST plus 0.01% Triton X-100 for 30 min, and stained with Phalloidin (Invitrogen) for 1 h at RT followed by three wash steps for 10 min. Pictures were taken from five optical fields ($\times 20$) on each well, and cell shape was analysed. In at least seven high-power fields consisting of at least 150 MS1 cells, the ratio of length between cellular long and short axis was quantified.

2.11 Tube formation assay

HUVEC cells were transfected with either negative siRNA or siRNA *Flna* 2 days before tube formation assay. Forty-eight-well plates were coated with growth factor-reduced Matrigel 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ following the manufacturer's instructions (BD Biosciences). After trypsinization, HUVECs were centrifuged; 1×10^4 cells were re-suspended in 250 μL complete DMEM containing 10% fetal bovine serum and seeded in each well. Cells were cultured in a 5% CO₂ incubator overnight. Five images were taken from each well by using an inverted microscope ($\times 40$). Tube length was quantified by using ImageJ software.

2.12 Immunoblotting and RAC-1 activity

Cell lysates were assayed by immunoblotting as described earlier.⁶ Primary antibodies directed against FLNA (Chemicon), FLNB (Chemicon), FLNC (Kinasource) p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2 (Cell Signaling), RAC-1 (Abcam), and actin (Sigma Aldrich) were used. The band densities of triplicated independent experiments were quantified by ImageQuant software (Bio-Rad). GTP-bound RAC1 was affinity precipitated with PAK1-GST (Rac1 Activation Kit; Pierce) following the manufacturer's instructions and was immunoblotted using antibody supplied in the kit (Millipore).

2.13 Quantitative PCR

mRNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and cDNA was synthesized with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems) according to the protocol provided by the manufacturer. Gene expression was analysed using TaqMan assays with mouse probes for *Flna* (Mm01187533_m1), *Flnb* (Mm01311723_m1), *Flnc* (Mm00471824_m1), and *Hprt* (Mm01545399_m1).

2.14 Statistics

All the values are mean \pm SD, and the differences between groups were evaluated with a two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA. The survival rates between groups were plotted by the Kaplan–Meier χ^2 test. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 FLNA is expressed by ECs in infarcted human and mouse hearts

To detect whether FLNA is expressed in infarcted hearts, we stained human biopsies of MI for FLNA. FLNA was expressed by infarcted human cardiac tissues. Particularly, endothelial structures in these tissues expressed FLNA as detected by double labelling of FLNA and CD31 (Figure 1A). The FLNA staining in infarcted mouse hearts is consistent with human biopsies as microvascular structures were positively stained for FLNA (Figure 1B). In addition to ECs, cardiac myocytes, vascular smooth muscle cells, and fibroblasts also expressed FLNA in heart sections (Supplementary material online, Figure S1A).

3.2 Deficiency of endothelial FLNA leads to enlargement and thinning of the cardiac wall following MI

To produce mice that are deficient for endothelial FLNA, we cross-bred female *Flna*^{fl/fl} mice with transgenic male mice expressing Cre under control of EC-specific *VE-Cadherin* promoter (*VE-CadCre*+) as reported earlier.⁶ Their male offspring with Cre expression and thus lacking FLNA specifically in ECs are designated as *Flna*^{fl/fl}/*VE-CadCre*+. Mice that are

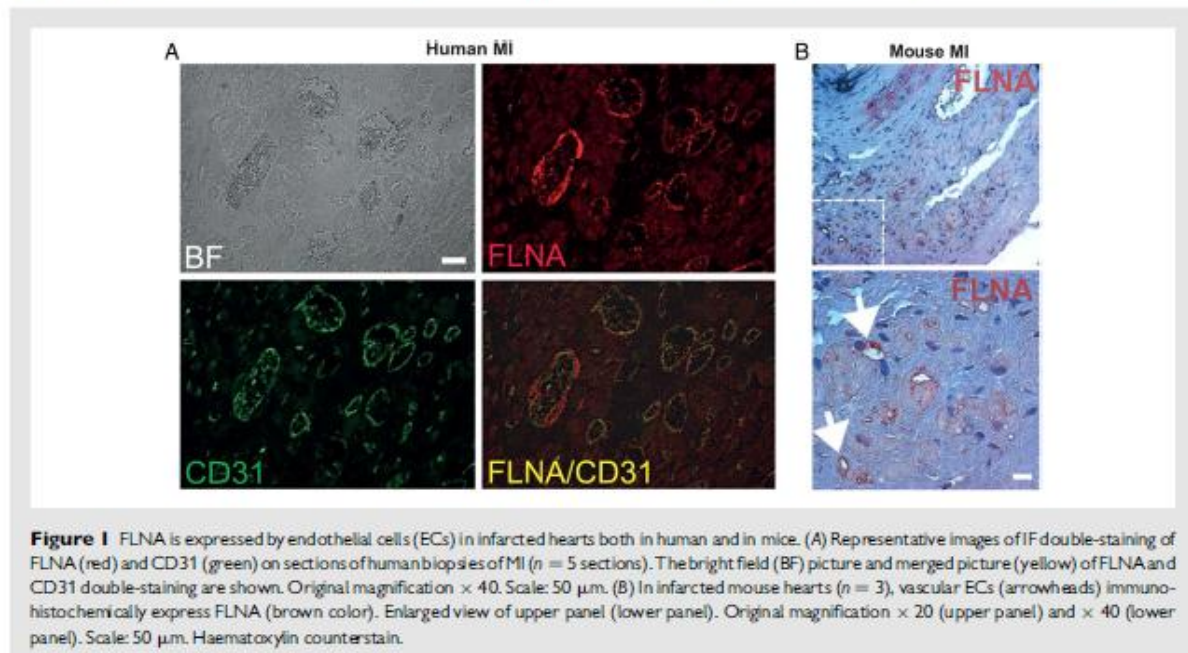
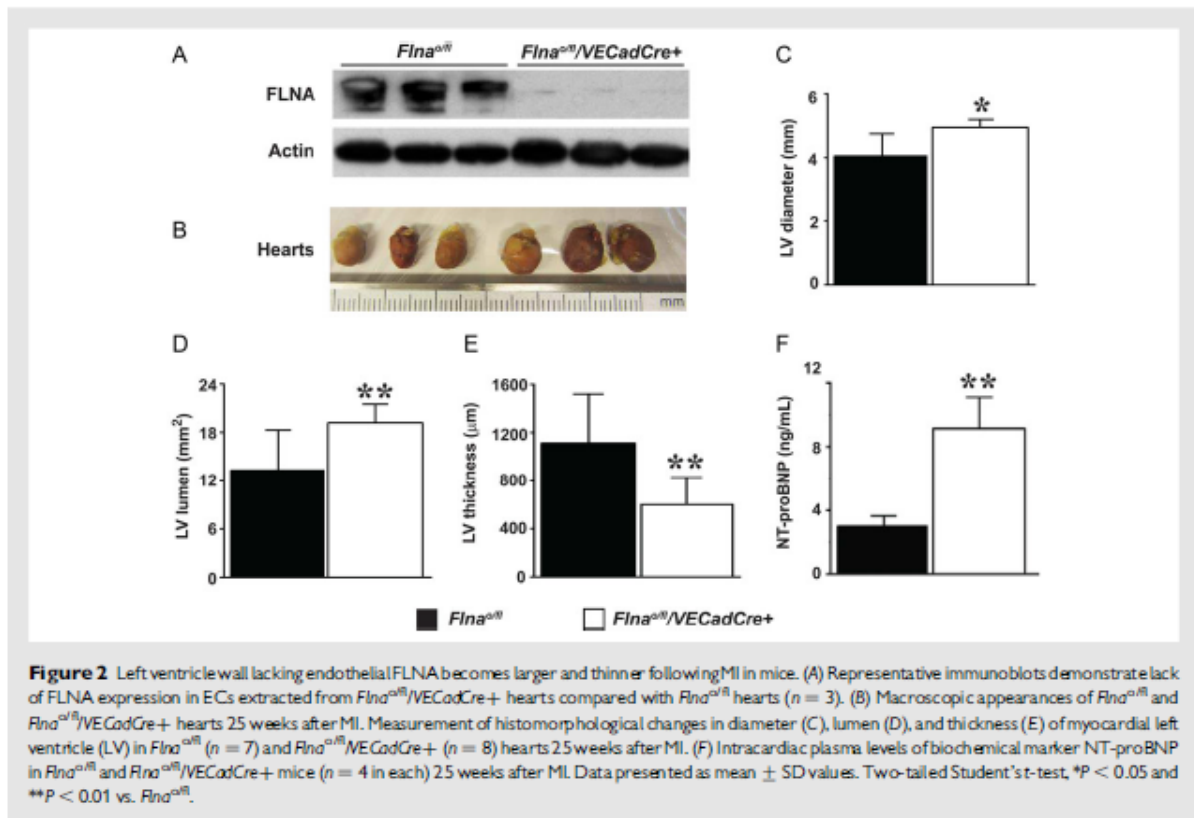


Figure 1 FLNA is expressed by endothelial cells (ECs) in infarcted hearts both in human and in mice. (A) Representative images of IF double-staining of FLNA (red) and CD31 (green) on sections of human biopsies of MI ($n = 5$ sections). The bright field (BF) picture and merged picture (yellow) of FLNA and CD31 double-staining are shown. Original magnification $\times 40$. Scale: 50 μm . (B) In infarcted mouse hearts ($n = 3$), vascular ECs (arrowheads) immunohistochemically express FLNA (brown color). Enlarged view of upper panel (lower panel). Original magnification $\times 20$ (upper panel) and $\times 40$ (lower panel). Scale: 50 μm . Haematoxylin counterstain.



deficient for endothelial FLNA survived normally and exhibited no cardiovascular malformation and no impairment in cardiac pump function and histomorphology at the basal level.⁶ To verify that ECs lack expression of FLNA, we extracted primary cardiac ECs and immunoblotted cell lysates for FLNA expression (Figure 2A). Our data indicated that FLNA is remarkably deleted in the ECs of *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts. These ECs also expressed FLNB and FLNC; however, no compensatory increase in the expression of either FLNB or FLNC was observed at the protein level in the FLNA-deficient ECs (Supplementary material online, Figure S1B and C). To determine whether endothelial expression of FLNA has a biological importance during cardiac remodelling, we induced MI by permanent ligation of the left coronary descending artery as described earlier⁸ and removed hearts for analysis 25 weeks after MI. There was no difference in the survival rate between *Flna*^{fl/fl} and *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ mice following MI ($P < 0.6$, χ^2 test). No difference in total cardiac weight between *Flna*^{fl/fl} and *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ (26.4 ± 2.6 vs. 27.5 ± 2.7 mg, $P = 0.4$) hearts was observed either. However, infarcted *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts were macroscopically larger compared with *Flna*^{fl/fl} control hearts (Figure 2B). To determine differences in cardiac morphology, we measured the diameter, lumen, and thickness of the LV wall. Compared with *Flna*^{fl/fl} control hearts, *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts displayed increases both in diameter (5.0 ± 0.5 vs. 4.0 ± 0.8 mm, $P < 0.05$) (Figure 2C) and in luminal areas (20.2 ± 4.1 vs. 13.1 ± 5.0 mm², $P < 0.01$) (Figure 2D), but decreases in thickness of the LV (598 ± 226 vs. 1111 ± 404 μ m, $P < 0.01$) (Figure 2E). To analyse whether the enlargement and thinning of LV wall result in a biochemical sign of cardiac failure, we measured the serum level of

NT-proBNP, which showed a significant increase in *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts compared with *Flna*^{fl/fl} hearts (9.1 ± 2.0 vs. 2.9 ± 0.6 ng/mL, $P < 0.01$) (Figure 2F).

3.3 Impaired cardiac function in infarcted hearts lacking endothelial FLNA

To determine whether morphological changes in hearts lead to consequences in cardiac function, we performed echocardiography at both the papillary and apex plane 25 weeks after MI (Table 1). At the papillary plane, *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts, in comparison with *Flna*^{fl/fl} controls, showed impairment in EF (20.6 ± 8.1 vs. $37.9 \pm 8.7\%$, $P < 0.01$) (Figure 3A and B). We further stressed hearts by intraperitoneal injection of dobutamine and collected images at the papillary level after 5 and 10 min (Table 2). At 10 min after the dobutamine stress test, *Flna*^{fl/fl} hearts showed an increase in EF (44.9 ± 8.3 vs. $31.2 \pm 6.0\%$, $P < 0.01$); however, *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts lacked this response (28.5 ± 11.5 vs. $21.1 \pm 11.5\%$, $P = 0.18$) (Figure 3C).

3.4 Increased infarction size and decreased capillarity in hearts lacking endothelial FLNA

Following echocardiography, hearts were removed for histological studies. To quantify infarction scar size, cardiac sections were stained with Masson's trichrome at six different levels (Figure 4A, left panels). The infarction scar size was increased in *Flna*^{fl/fl}/VECadCre+ hearts 2.6-fold compared with *Flna*^{fl/fl} hearts ($P < 0.001$) (Figure 4A, right

Table 1 Cardiac function parameters

	Papillary plane		Apex plane	
	<i>Flna^{o/e}</i> (n = 7)	<i>Flna^{o/e}/VECadCre+</i> (n = 8)	<i>Flna^{o/e}</i> (n = 5)	<i>Flna^{o/e}/VECadCre+</i> (n = 5)
Diastolic outer wall area (mm ²)	33.0 ± 8.8	37.7 ± 6.4	18.6 ± 4.7	23.8 ± 10.2
Diastolic lumen area (mm ²)	20.6 ± 5.8	25.4 ± 4.6	13.0 ± 2.5	19.6 ± 8.2
Systolic lumen area (mm ²)	13.1 ± 4.9	20.2 ± 4.0**	9.7 ± 3.9	17.8 ± 7.4
Fractional area change (%)	37.9 ± 8.4	20.6 ± 7.9***	28.6 ± 10.3	17.3 ± 2.7
Left ventricle length (mm)	8.5 ± 0.4	8.7 ± 0.4		
Heart rate (bpm)	328 ± 45	298 ± 35		

Data presented as mean ± SD.

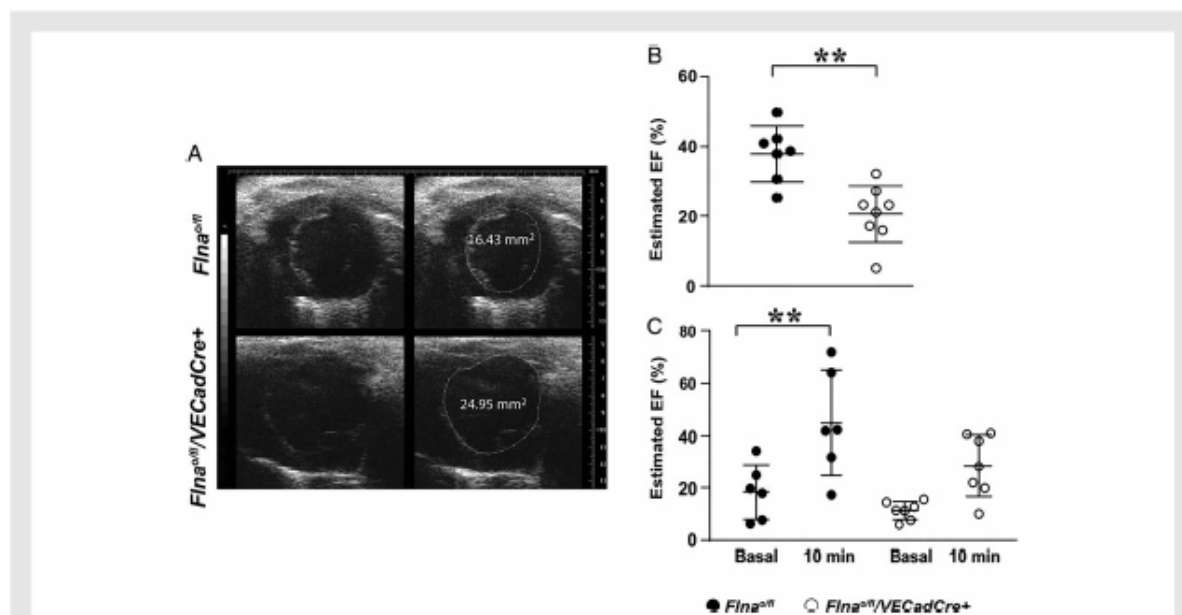
P < 0.01 increase and *P < 0.01 decrease vs. respective *Flna^{o/e}* group.

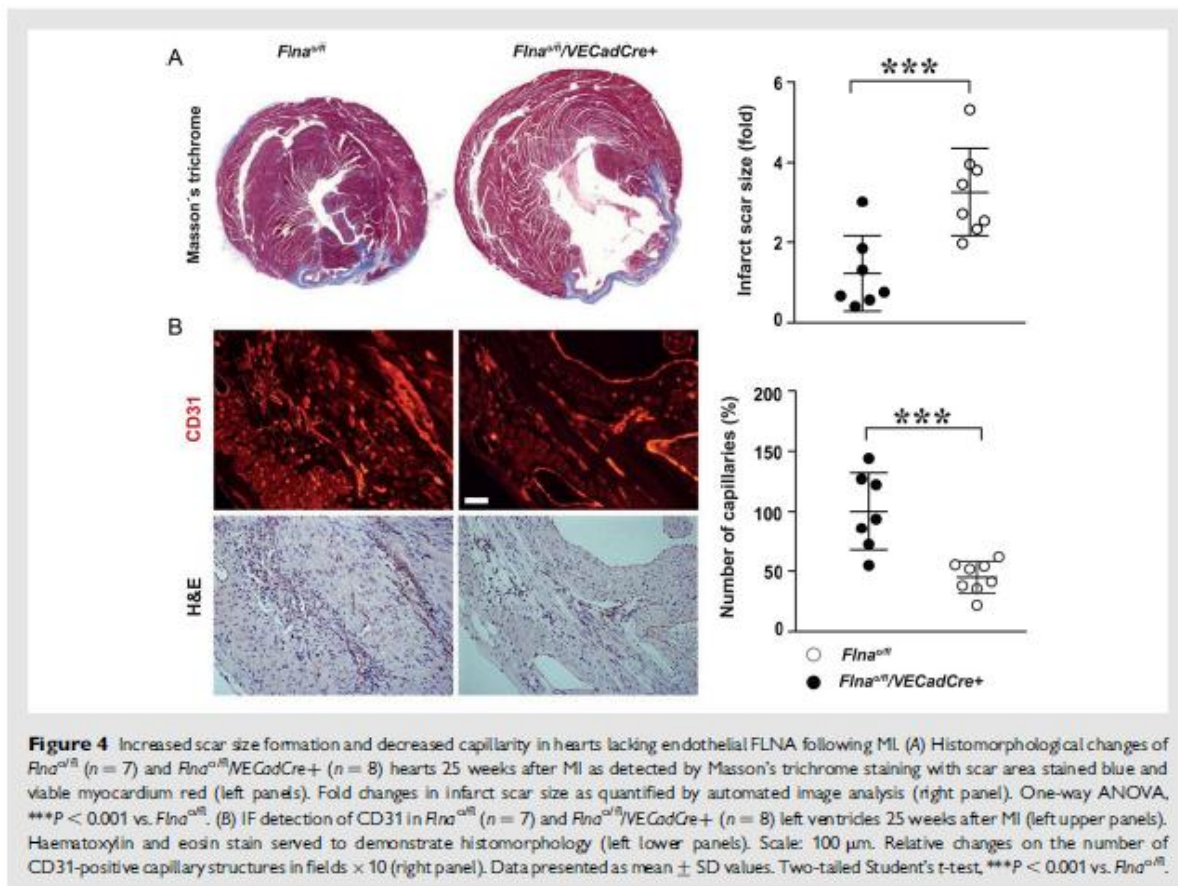
Figure 3 Impaired cardiac function in mouse hearts lacking endothelial FLNA following MI (A) Short-axis images at the papillary level using echocardiography 25 weeks after MI. Upper panels represent *Flna^{o/e}*, whereas lower panels demonstrate *Flna^{o/e}/VECadCre+* hearts. Diastolic luminal area is delineated to the right. (B) Percentages of estimated EF in the left ventricle of *Flna^{o/e}* (n = 7) and *Flna^{o/e}/VECadCre+* (n = 8) hearts 25 weeks after MI. Data presented as mean ± SD values. **P < 0.01 vs. *Flna^{o/e}*. (C) Comparison of EF after stress induction by dobutamine at 10 min between *Flna^{o/e}* (n = 6) and *Flna^{o/e}/VECadCre+* hearts (n = 7) 25 weeks after MI. Data presented as mean ± SD values. Paired t-test, **P < 0.01 vs. basal level.

Table 2 Cardiac function parameters under dobutamin stress at papillary plane

	Basal		5 min		10 min	
	<i>Flna^{o/e}</i>	<i>Flna^{o/e}/VECadCre+</i>	<i>Flna^{o/e}</i>	<i>Flna^{o/e}/VECadCre+</i>	<i>Flna^{o/e}</i>	<i>Flna^{o/e}/VECadCre+</i>
Diastolic lumen area (mm ²)	18.8 ± 5.2	24.4 ± 2.2*	17.2 ± 4.6	21.9 ± 2.7*	17.2 ± 5.2	22.6 ± 4.2
Systolic lumen area (mm ²)	13.3 ± 5.1	19.2 ± 2.2**	11.1 ± 5.2	16.0 ± 3.5	10.6 ± 5.0	16.1 ± 3.6*
Fractional area change (%)	31.2 ± 15.3	21.1 ± 6.0	42.9 ± 19.3	27.4 ± 12.3	44.9 ± 19.3	28.5 ± 11.5
Heart rate (bpm)	317 ± 62	309 ± 52	379 ± 27	417 ± 75	408 ± 36	413 ± 21

Data presented as mean ± SD (n = 6–7 in each group).

*P < 0.05 and **P < 0.01 increase vs. respective *Flna^{o/e}* group.



panel). As blood vessel remodelling is crucial for myocardial healing after MI and *Flna* deficiency results in impaired tumour capillarity,⁶ we assessed capillary structures of these hearts by immunohistochemistry with CD31 antibody (Figure 4B, left panels). Interestingly, there was no difference in the number of CD31-positive capillaries in non-infarcted myocardium between *Flna*^{+/+} and *Flna*^{+/+}/VECadCre+ hearts (798.8 ± 145.4 vs. 820.2 ± 283.8 cells per field × 10, *P* = 0.8). However, we observed a significant decrease in capillarity by 55% in the entire infarcted area of *Flna*^{+/+}/VECadCre+ hearts compared with *Flna*^{+/+} hearts (414.1 ± 133.3 vs. 186.0 ± 54.4 cells, *P* < 0.001) (Figure 4B, right panel). In the infarcted areas, there were no differences in the number of Ki67-positive replicating cells between *Flna*^{+/+} (18.6 ± 24.6 cells in high-power field) and *Flna*^{+/+}/VECadCre+ (18.4 ± 13.3 cells in high-power field) hearts.

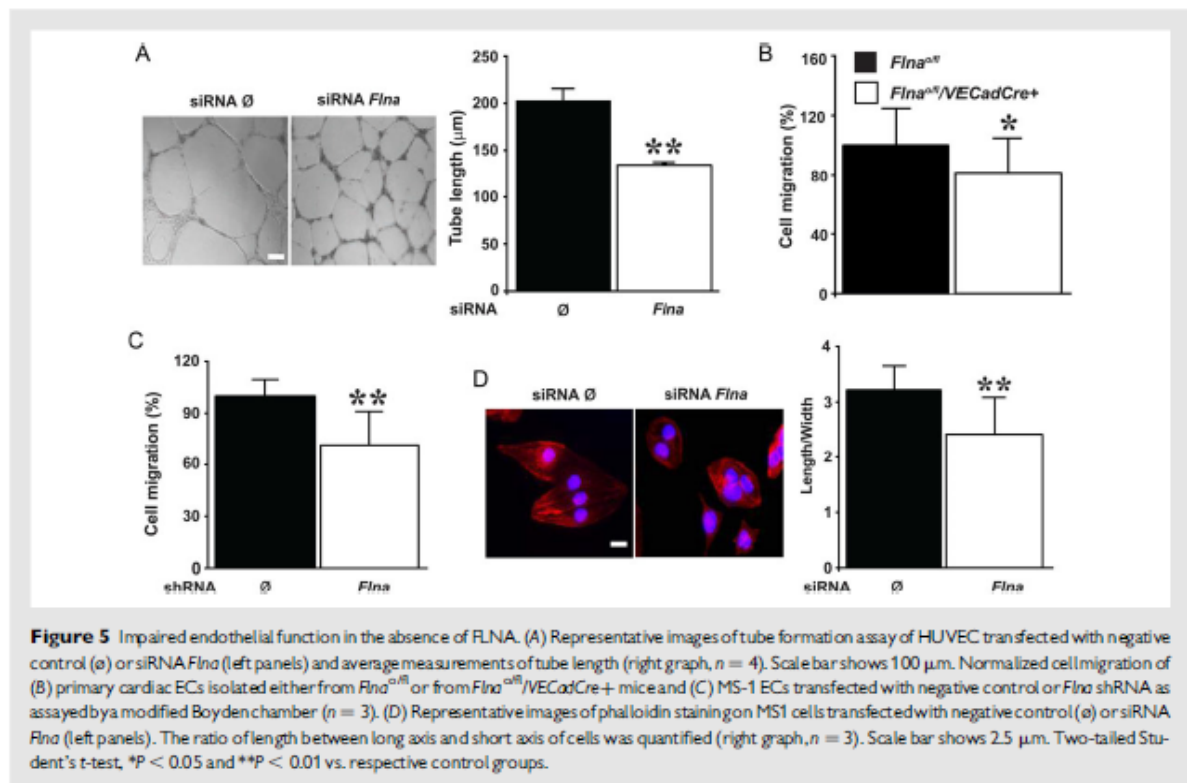
3.5 Absence of FLNA impairs endothelial tube formation and migration

The reduced capillarity in *Flna*^{+/+}/VECadCre+ hearts is likely caused by compromised angiogenesis of *Flna*-deficient ECs. To measure the ability of ECs to form capillary-like structures, we performed a tube formation assay using HUVEC in Matrigel. The efficient knockdown of *Flna* in HUVEC (Supplementary material online, Figure S2) displayed significantly reduced tube length compared with control cells (203 ± 3.21 vs. 134 ± 1.61 μm, *P* < 0.01) (Figure 5A). The shortened tube length

can be caused by impaired EC migration as a result of *Flna* deficiency as reported earlier in tumours.⁶ We therefore tested this hypothesis both on primary cardiac ECs deficient for FLNA (Figure 5B) and on *Flna* knockdown MS1 ECs (Figure 5C), and observed a significant reduction in cell migration by 19% (*P* < 0.05) and 29% (*P* < 0.01), respectively. In addition, non-silenced and *Flna* knockdown MS1 cells displayed different morphology *in vitro*. Non-silenced MS1 cells were characterized by an elongated morphology with apparent ventral stress fibres, while *Flna* knockdown MS1 cells displayed more round shape (Figure 5D, left panels). The ratio of length between long and short axis of *Flna* knockdown MS1 ECs was dropped significantly (from 3.2 ± 0.6- to 2.4 ± 0.4-folds, *P* < 0.01, Figure 5D, right panel).

3.6 Lack of FLNA compromises endothelial signalling

To determine the molecular mechanisms behind the decreased tubular formation and cell migration, we studied the expression of signalling molecules p-AKT, p-ERK 1/2, and RAC-1 that are essential for cell migration and angiogenesis (Figure 6A). These studies indicated reduced levels of p-AKT (by 54%, *P* < 0.001, Figure 6B), p-ERK1/2 (by 19%, *P* < 0.05, Figure 6C), and RAC-1 (by 52%, *P* < 0.05, Figure 6D) in ECs transfected with shRNA *Flna* compared with cells transfected with control shRNA ∅. Consistent with MS1 ECs, *Flna* knockdown HUVEC also displayed significantly reduced p-AKT (Supplementary material online, Figure S2).



Importantly, the RAC-1 activity was decreased by 51% in MS1 ECs transfected with shRNA *Flna* ($P < 0.05$, Figure 6E). VEGF-A is one of the activators of AKT/ERK/RAC-1 signalling pathway. We found a decrease in the level of secreted VEGF-A from cultured MS1 ECs after *Flna* silencing (217.5 ± 23.2 vs. 108.0 ± 7.0 pg/mL, $P < 0.01$, Figure 6F). Consistent with this finding, *Flna*^{fl/fl}/VEGfCre+ mice also produced significantly lower level of secreted VEGF-A in the circulating blood compared with *Flna*^{fl/fl} mice (12.1 ± 2.5 vs. 17.1 ± 0.7 pg/mL, $P = 0.05$, Figure 6G) after MI.

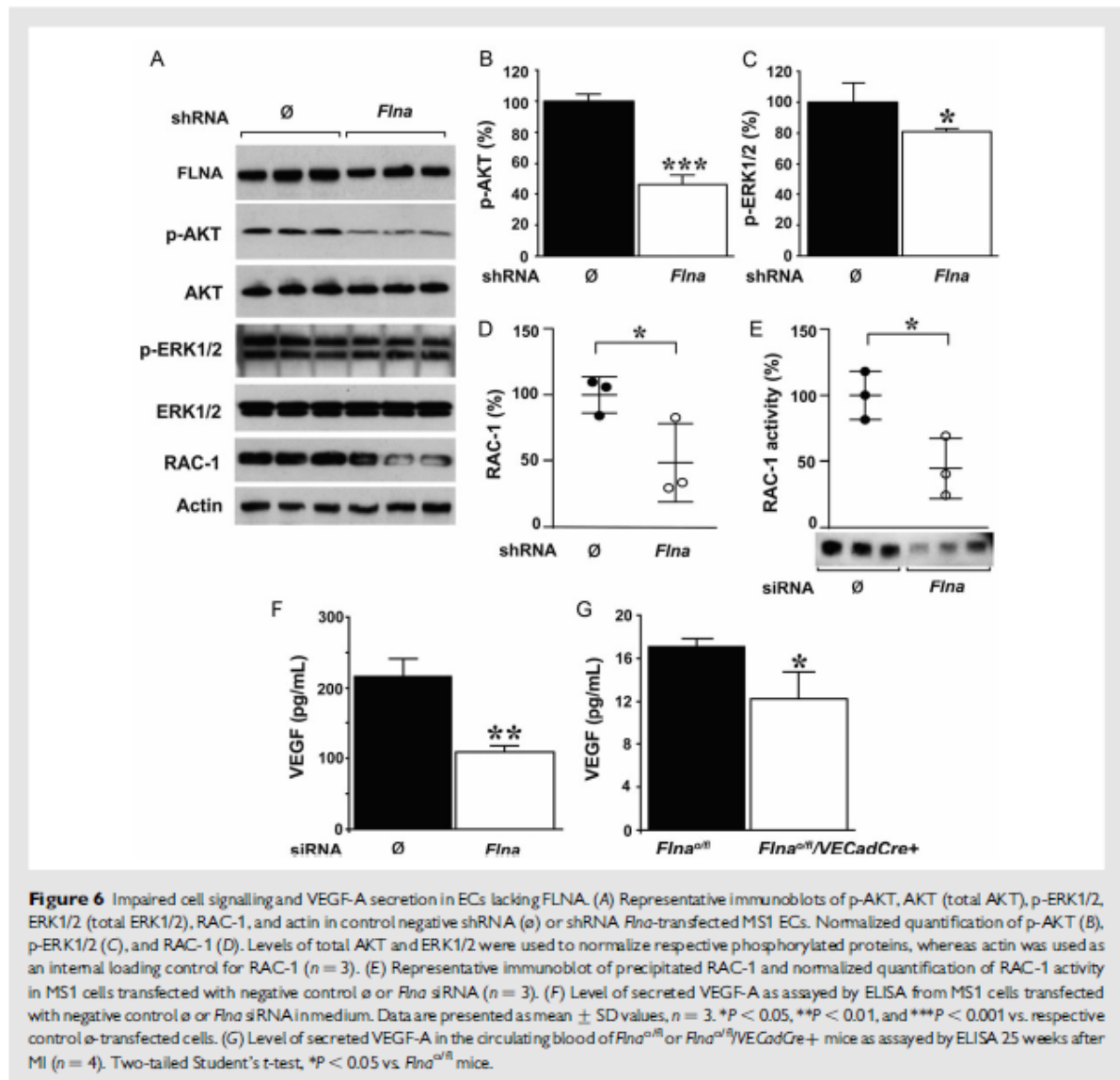
4. Discussion

This study evaluated the impact of endothelial FLNA deletion on MI-induced LV remodelling and dysfunction, focusing on the EC function and signalling. The major findings are as follows: (i) FLNA is expressed by myocardial ECs after MI; (ii) endothelial deletion of FLNA leads to impaired LV remodelling and dysfunction, accompanied by increased MI size, thinning of LV wall, and enlargement of LV lumen; (iii) FLNA deficiency in ECs leads to reduced capillarity in infarcted hearts; and (iv) EC signalling is impaired by the absence of FLNA, resulting in reduced EC tube formation and migration. Taken together, these findings demonstrate that FLNA deficiency in vascular ECs aggravates post-MI remodelling and cardiac dysfunction by impairing EC signalling and migration. Importantly, this study deepens our understanding of FLNA function in EC biology and cardiovascular diseases, in addition to our preconceived idea that FLNA primarily plays structural roles in the cytoplasm.

Recently, an increasing number of reports indicates that cardiovascular defects are associated with the loss of FLNA function in humans.³ The

X-linked form of hereditary cardiac valvular dystrophy and cardiac valve disease are linked to mutations in the *FLNA* gene.¹⁰ FLNA is highly expressed in ECs, the endocardial cushion, and mesenchymal cells.¹¹ Furthermore, deficiency of *Flna* in mice results in severe malformations in the heart and blood vessels, suggesting that FLNA affects the development of the endocardial cushion which is essential for cardiovascular morphogenesis.⁴ All these previous findings point to a potential role of endothelial FLNA in cardiovascular development. Surprisingly, our mice lacking FLNA specifically in ECs grow normally and their cardiac functions appear to be normal.⁶ Thus, we questioned whether endothelial FLNA could play a role in cardiovascular diseases such as MI when the demand for cellular signalling mediated by FLNA is increased. As we have shown, FLNA is expressed in the infarcted area after MI, while its consequence on myocardial remodelling and function has not been explored. In this study, we found that endothelial deletion of FLNA led to worsened histomorphological and functional properties in infarcted hearts. In addition, mice that are deficient for endothelial FLNA had no response to dobutamine stress, indicating that the cardiac motility reserve is compromised in these mice. Finally, the elevated NT-proBNP levels in mice lacking endothelial FLNA indicated exacerbated MI-induced LV failure. Therefore, deletion of endothelial FLNA alone is not sufficient to retard heart development, whereas in MI, if expression of endothelial FLNA is not present, aberrant myocardial remodelling and heart dysfunction occur.

Due to the limited regenerative capacity of the mammalian myocardium, a proper angiogenic response is required to repair the substantial loss of cardiomyocytes during MI, both to provide nutrients and to maintain normal blood vessel wall function. Thus, fully functional ECs are of



great importance to form a new vasculature and to prevent progressive LV remodelling. Endothelial malfunction may partly contribute to the phenotype that accounts for the severe cardiac developmental defects in mice deficient for FLNA.⁴ Moreover, in patients with multiple myeloma, FLNA is implicated in multiple endothelial angiogenesis-related functions, including cell spreading, migration, and tubular morphogenesis.¹² We therefore tested whether endothelial FLNA could impact angiogenesis in infarcted hearts. Interestingly, the number of formed capillary structures was not altered in non-infarcted myocardium but was significantly reduced in infarcted areas in hearts lacking endothelial FLNA, which likely results in increased infarction size. These findings suggest that the pro-angiogenic function of FLNA is only induced under stressed conditions, which may explain the normal phenotype of mice lacking endothelial FLNA. In contrast, no difference in EC proliferation was observed between hearts expressing and lacking

endothelial FLNA in this study, indicating that the reduced capillary may be due to impaired migration of pre-existing ECs.

In the heart, both the vasculature and interior surfaces of the chambers called endocardium are covered by ECs. Active migration of pre-existing ECs towards an ischaemic stimulus may precede cell proliferation during cardiac adaptive angiogenesis. FLNA has been implicated in both proliferation and migration processes, though the published results are controversial in various cell types. In our study, we found that FLNA does not regulate EC proliferation. Thus, the impaired angiogenesis observed in hearts lacking endothelial FLNA is likely mediated by reduced cell migration. In support of this hypothesis, we have earlier found that targeted deletion of FLNA in ECs leads to reduced migration and angiogenesis in cancer cells and thus tumour growth in mice.⁶ In this study, we observed that both genetic deletion of FLNA in primary cardiac ECs and acute knockdown of FLNA

expression in transformed ECs inhibit cell migration. Since ECs play a crucial role in the formation of blood vessels, decreased cell migration may result in poor angiogenesis in these mouse hearts that are stressed with MI.

The VEGF signalling pathway plays an essential role in the initiation and regulation of angiogenesis during MI.¹³ Interestingly, we have recently shown that the naturally occurring C-terminal fragment of FLNA interacts with HIF-1 α in tumour cells.¹⁴ As a consequence of this interaction, secretion of VEGF-A is up-regulated during hypoxia. HIF-1 α and VEGF are also up-regulated during MI and regulate hypoxia-stimulated angiogenesis.^{15,16} Importantly, we showed in this study that mice with infarcted hearts lacking endothelial FLNA secrete less VEGF-A. VEGF-A can readily bind to its plasma membrane receptor VEGFR-2 on ECs and activate its downstream pathways, including the AKT, ERK, and small GTPase RAC-1 signalling pathways.¹⁷ Our immunoblotting data confirmed a decrease in the level of active RAC-1 and phosphorylated AKT and ERK in ECs lacking FLNA, indicating that impaired VEGF-A production may at least be one cause of the reduced migration in these cells. The differential morphology between non-silenced and *Flna* knockdown ECs were reminiscent of FLNA-expressing and -lacking melanoma cells, which may account for the differential migration capability. Thus, FLNA may regulate angiogenesis through either direct interaction with small GTPases or indirect regulation of VEGF-A secretion that reciprocally activate MAPK signalling. FLNB, another filamin isoform, has been shown to regulate EC migration by interacting with RAC1.¹⁸ Whereas FLNA has been shown to interact with small GTPases RhoA, Cdc42, and RAC-1 in other cell types,² its functional importance in ECs has not been studied. Our study provides the first evidence that FLNA-regulated RAC-1 signalling may be involved in angiogenesis in MI.

In conclusion, endothelial FLNA deletion aggravated post-MI LV dysfunction and cardiac failure by blunting the angiogenic responses that are necessary for proper wound healing. Therefore, inducing FLNA and associated pathways in the post-MI setting would likely provide a favourable approach to inhibit abnormal cardiac remodelling post-MI.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Conflict of interest: none declared.

Funding

We acknowledge the support from the Sahlgrenska Hospital Funds and Swedish Cancer Society (to LMA).

References

1. Sasayama S, Fujita M. Recent insights into coronary collateral circulation. *Circulation* 1992; **85**:1197–1204.
2. Zhou AX, Hartwig JH, Akyürek LM. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends Cell Biol* 2010; **20**:113–123.
3. Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nature Gen* 2003; **33**:487–491.
4. Feng YY, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, Kwiatkowski DJ, Walsh CA. Filamin A (*flna*) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:19836–19841.
5. Takafuta T, Wu GX, Murphy GF, Shapiro SS. Human beta-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Iba. *J Biol Chem* 1998; **273**:17531–17538.
6. Nallapalli RK, Ibrahim MX, Zhou AX, Bandaru S, Sunikara SN, Redfors B, Pazooki D, Zhang Y, Borén J, Cao Y, Berge MO, Akyürek LM. Targeting filamin A reduces K-Ras-induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice. *Mol Cancer* 2012; **11**:E50.
7. Tian F, Zhou X, Wikström J, Karlsson H, Sjöland H, Gan LM, Borén J, Akyürek LM. Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; **297**:H1078–H1086.
8. Tian F, Zhou AX, Smits AM, Larsson E, Goumans MJ, Heldin CH, Borén J, Akyürek LM. Endothelial cells are activated during hypoxia via Endoglin/Alk-1/Smad1/5 signaling in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **392**:283–288.
9. Deininger MH, Wybranietz WA, Graeppler FT, Lauer UM, Meyermann R, Schluessener H-J. Endothelial endostatin release is induced by general cell stress and modulated by the nitric oxide/cGmp pathway. *FASEB* 2003; **17**:1267–1276.
10. Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, Newbury-Ecob R, Tran V, Young I, Trochu JN, Le Marec H, Schott JJ. Mutations in the gene encoding filamin A as a cause for familial cardiac valvular dystrophy. *Circulation* 2007; **115**:40–49.
11. Norris RA, Moreno-Rodriguez R, Wessels A, Merot J, Bruneval P, Chester AH, Yacoub MH, Hagege A, Slaughter SA, Alkawa E, Schott JJ, Lardoux A, Harris BS, Williams LK, Richards A, Levine RA, Markwald RR. Expression of the familial cardiac valvular dystrophy gene, filamin-A, during heart morphogenesis. *Dev Dyn* 2010; **239**:2118–2127.
12. Bernard S, Calvano A, Ria R, Nico B, Savino R, Terracciano R, De Tullio G, Ferrucci A, De Luisi A, Moschetti M, Mangalardi G, Catacchio L, Basile A, Guarini A, Zito A, Dittono P, Musto P, Dammacco F, Ribatti D, Vacca A. Four proteins governing overangiogenic endothelial cell phenotype in patients with multiple myeloma are plausible therapeutic targets. *Oncogene* 2012; **31**:2258–2269.
13. Ho VC, Duan LJ, Cronin C, Liang BT, Fong GH. Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice. *Circulation* 2012; **126**:741–752.
14. Zheng X, Zhou X, Roubi P, Uramoto H, Borén J, Cao Y, Pereira T, Akyürek LM, Poellinger L. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**:2560–2565.
15. Bing RJ. Myocardial ischemia and infarction: growth of ideas. *Cardiovasc Res* 2001; **51**:13–20.
16. Kasisvathanan V, Shalhoub J, Lim CS, Shepherd AC, Thapar A, Davies AH. Hypoxia-inducible factor-1 in arterial disease: a putative therapeutic target. *Current Vasc Pharmacol* 2011; **9**:333–349.
17. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Dawy A, Deutsch U, Luthi U, Barbets A, Benjamin LE, Malinen T, Nobes CD, Adams RH. Ephrin b2 controls vegf-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010; **465**:483–486.
18. Del Valle-Perez B, Martinez VG, Lacasa-Salavert C, Figueras A, Shapiro SS, Takafuta T, Casanovas O, Capella G, Ventura F, Vinals F. Filamin B plays a key role in vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility through its interaction with Rac-1 and Vav-2. *J Biol Chem* 2010; **285**:10748–10760.