

Faculty Faculty of Pharmacy		Department Department of Pharmacology and Toxicology	
Author Heiskanen Suvi Johanna			
Title Cyclin dependent kinase 5 in endothelial cell migration			
Subject Pharmacy			
Level Pro gradu - Master thesis	Month and year March 2010	Number of pages 73	
<p>Abstract</p> <p>Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) is studied to take part in the migration neurons and development of brain. It is proven to participate also in the mediation of endothelial cell migration and angiogenesis. Angiogenesis is a crucial physiological mechanism in mediating wound healing and menstrual cycle among other functions. It is also important in some patophysiological processes like diabetic retinopathy and tumour outgrow. Tumour is shown to need its own vascularisation after reaching a size of 2-3 mm as a diameter in order to proceed growing. This makes Cdk5 a potential therapeutic target in regulating angiogenesis.</p> <p>In order to be activated, Cdk5 forms a complex together with its neuronal activator p35 or p39, or with their respective cleavage products p25 or p29. The mechanisms, how Cdk5 is activated in human ehdothelial cells has not been studied before. This master thesis is to evaluate the existence of Cdk5 activators p35 and p39 and their respective cleavage products in spreading human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to mimic the cell migration by freshly plating the cells. In our studies we performed western blot analysis and quantitative PCR analysis to investigate the expression of p35 and p25 in spreading HUVECs in different time points. We also performed an immunofluorescence assay to investigate the localisation of p35 and p25 in spreading HUVECs using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The expression of p35 and p25 was also studied after growth factor stimulation (VEGF, FGF). The expression of the activator p39 in spreading HUVECs was studied using quantitative PCR method. Finally we investigated the interaction of Cdk5 with its activator p35 and its cleavage product p25 in spreading HUVECs using immunoprecipitation (IP).</p> <p>We were able to show in our studies that the activators p35 and p25 are expressed in HUVECs and that their expression is changing in spreading HUVECs in different time points. Additionally we were able to show, that p35 and p25 are partly localized in periphery in spreading cells. We were able to show that also the activator p39 is expressed in spreading HUVECs, but its relative amount was shown to be only a small portion of p35 in HUVECs. We were able to prove the interaction of Cdk5 with its activator p35 and p25 using immunoprecipitation, although the result could not be completely verified. Stimulation with growth factors showed no appreciable changes in the expression of p35 or p25.</p> <p>Based on the results, we can state that both the activator p35 and p39, and at least p25, the cleavage product p35, are expressed also in HUVECs. As they are neuronal activators of Cdk5 and Cdk5 has shown to participate in the mediation of angiogenesis and endothelial cell migration, the results amplify our hypothesis that also these activators might have a role in mediating endothelial cell migration and angiogenesis. Nevertheless to assure it, to specify the possible different roles of each activators and their interaction with Cdk5, further studies are needed.</p>			
Keywords Cdk5, angiogenesis, p35, p39, p25			
Where deposited University of Helsinki, Faculty of Pharmacy			
Additional information Supervisors: Stefan Zahler, Department of Pharmacy, Center for Drug research, Pharmaceutical Biology, Ludwig Maximilians University of Munich, Germany Raimo Tuominen, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki			

Tiedekunta Farmasian tiedekunta		Osasto Farmakologian ja toksikologian osasto
Tekijä Heiskanen Suvi Johanna		
Työn nimi Cyclin dependent kinase 5 in endothelial cell migration		
Oppiaine Farmasia		
Työn laji Pro gradu tutkielma	Aika Maaliskuu 2010	Sivumäärä 73
<p>Tiivistelmä</p> <p>Sykliineistä riippuvainen kinaasi 5 (Cdk5) on todettu osallistuvan neuronien migraation ja aivojen kehittymisen säätelyyn. Sen osallisuus on todistettu myös endoteelisolujen migraation ja angiogeneesin säätelyssä. Angiogeneesi on tärkeä fysiologinen mekanismi mm. haavan paranemisen ja kuukautiskierron yhteydessä. Sillä on todettu olevan rooli myös joissakin patofysiologisissa prosesseissa kuten diabeetisessa retinopatiassa ja syöpäkasvainten kasvussa. Syöpäkasvain tarvitsee oman verisuonistuksensa, jotta se voi jatkaa kasvuaan saavuttaessaan 2-3 mm halkaisijan läpimitan. Tämä tekee Cdk5 roolista potentiaalisen terapeuttisen kohteen angiogeneesin säätelyssä.</p> <p>Aktivoituakseen Cdk5:n on muodostettava kompleksi sen neuronaalisen aktivaattorin p35:n tai p39:n kanssa, tai niiden pilkkoutumistuotteiden p25:n tai p29:n kanssa. Cdk5 aktivoitumismekanismia ei ole ennen tutkittu endoteelisoluissa, joten tämän Pro gradu tutkielman tarkoituksena oli tutkia Cdk5 aktivaattoreiden ja niiden pilkkoutumistuotteiden ilmentymistä humaani endoteelisoluissa. Tutkimuksissa pyrittiin selvittämään aktivaattoreiden ilmentymistä napanuoran laskimosta eristetyissä humaani endoteelisoluissa (HUVEC) imitoimalla solumigraatiota jakamalla solut levittäytymään solumaljoille. Tutkimuksessa selvitettiin p35:n ja p25:n ilmentymistä eri aikapisteissä mitattuina levittäytyvissä endoteelisoluissa western blot menetelmän ja kvantitatiivisen PCR menetelmän avulla. Lisäksi tutkittiin p35:n ja p25:n lokalisaatiota levittäytyvissä soluissa fluoresenssivärjäyksen ja konfokaalimikroskopoinnin avulla. P35:n ja p25:n ilmentymistä tutkittiin myös stimuloimalla soluja eri kasvutekijöillä (VEGF, FGF). Toisen aktivaattorin p39 ilmentymistä tutkittiin levittäytyvissä soluissa kvantitatiivisen PCR menetelmän avulla. Lisäksi p35:n ja p25:n interaktiota Cdk5:n levittäytyvissä soluissa tutkittiin immunosaostuksen avulla.</p> <p>Kokeiden avulla voitiin osoittaa että aktivaattoreiden p35 ja p25 pitoisuudet muuttuvat levittäytyvissä soluissa eri aika pisteissä mitattuna. Lisäksi voitiin osoittaa, että p35 ja p25 paikantuvat levittäytyvissä soluissa solujen reuna-alueille. p39:n ilmentymisen todettiin olevan vain pieni osa p35:n määrästä. Immunosaostuksen avulla voitiin osoittaa interaktio kinaasin ja p35:n välillä, joskin tulosta ei voitu täysin varmistaa. Kasvutekijöillä stimuloituissa soluissa ei voitu osoittaa muutosta aktivaattoreiden p35 ja p25 ilmentymisessä.</p> <p>Tulosten pohjalta voidaan todeta, että aktivaattorit p35 ja p39, sekä ainakin p35:n pilkkoutumistuote p25 ilmentyvät myös humaani endoteelisoluissa, joissa Cdk5 on todettu osallistuvan angiogeneesin ja endoteelisolujen migraation säätelyyn. Tulokset vahvistavat hypoteesia, että näillä aktivaattoreilla on rooli endoteelisolujen migraatiossa, joskin sen varmistaminen, eri aktivaattoreiden rooli sekä yhteys Cdk5:n aktivoitumiseen vaativat vielä lisätutkimuksia.</p>		
Avainsanat Cdk5, angiogeneesi, p35, p25, p39		
Säilytyspaikka Helsingin Yliopisto, Farmasian tiedekunta		
Muita tietoja Ohjaajat: Stefan Zahler, Department of Pharmacy, Center for Drug research, Pharmaceutical Biology, Ludwig Maximilians University of Munich, Saksa Raimo Tuominen, Farmakologian ja Toksikologian osasto, Farmasian tiedekunta, Helsingin Yliopisto		