

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A protein foszfatáz-1 aktiválási és gátlási mechanizmusainak szerepe sejtfolymatok szabályozásában

Tóth Emese

Témavezető: Dr. Kiss Andrea



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
1.1. Reverzibilis fehérje foszforiláció/defoszforiláció	9
1.2. A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok jellemzése és csoportosítása	9
1.2.1. A protein foszfatáz-1 szerkezete	11
1.2.2. A protein foszfatáz-2A szerkezete	11
1.3. A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok szabályozása természetes vegyületekkel és inhibitor fehérjékkel.....	12
1.3.1. PP1 és PP2A gátlása toxinokkal és tanninokkal.....	12
1.3.2. Protein foszfatáz-1 gátló fehérjék.....	13
1.3.3. A CPI-17 fehérjecsald és a LIMK2 fehérje.....	14
1.4. A protein foszfatáz-1 szabályozása regulátor alegységekkel	16
1.5. A miozin foszfatáz	16
1.5.1. A miozin foszfatáz alegységszerkezete	16
5.3. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepük	21
1.6. A protein foszfatáz-1 és a miozin foszfatáz szerepe leukémiában.....	24
1.7. A protein foszfatáz-1 szerepe makrofág differenciációban	25
2. CÉLKITŰZÉSEK	27
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
3.1. Anyagok.....	28
3.2. Antitestek	28
3.3. Sejttenyésztés	29
3.4. THP-1 sejtek kezelése és lízise	29
3.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot.....	30
3.6. A Flag-LIMK2v1 vektor	30
3.7. Irányított mutagenézis	31
3.8. Flag-LIMK2v1 transzfekció	32
3.9. Immunprecipitáció	32
3.10. <i>In vitro</i> fehérje foszforiláció.....	33
3.11. Flag-LIMK2v1 tiofoszforilációja és tisztítása	33

3.12. Protein foszfatáz aktivitás meghatározása	34
3.13. Immunfluoreszcencia	34
3.14. Életképesség vizsgálata Alamar Blue tesztel.....	35
3.15. Sejtek letapadásának vizsgálata szulforodamin B tesztel.....	35
3.16. Elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés (ECIS)	36
3.17. Statisztikai analízisek	36
4. EREDMÉNYEK.....	37
4.1 A LIMK2v1 foszfatázgátló szerepének vizsgálata.....	37
4.1.1. A Flag-LIMK2v1-t foszforiláló kinázok azonosítása	37
4.1.2. A Flag-LIMK2v1 foszforilálódó oldalláncának azonosítása	39
4.1.3. Flag-LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata.....	40
4.2. A miozin foszfatáz szerepe THP-1 leukémiás sejtek kemoszenzitivitásában	41
4.2.1. Az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonal komponenseinek jelenléte és lokalizációja THP-1 sejtekben.....	41
4.2.2. Az EGCG hatása THP-1 sejtek kemoszenzitivitására.....	43
4.2.3. EGCG hatása a MYPT1 regulátor alegység és a MP szubsztrátjainak foszforilációjára és aktivitására	46
4.3. A miozin foszfatáz szerepe THP-1 sejtek makrofág differenciációja során.....	47
4.3.1. THP-1 sejtek foszfatáz aktivitásának változása makrofág-differenciáció során.....	47
4.3.2. A miozin foszfatáz expressziójának és foszforilációjának változása THP-1 sejtek PMA- illetve VD ₃ -indukált differenciációja során	48
4.3.3. H1152 hatása a MYPT1 és MLC20 foszforilációjára, illetve a sejtek proliferációjára THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja során	50
4.3.4. Az EGCG hatása a MYPT1 és MLC20 foszforilációjára és a sejtek proliferációjára THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja során.....	52
4.3.5. A miozin foszfatáz hatása a differenciálódó makrofágok letapadási képességére	53
5. MEGBESZÉLÉS.....	55
A LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata	55
A miozin foszfatáz szerepe THP-1 sejtek kemoszenzitivitásának szabályozásában.....	57
A miozin foszfatáz szabályozó szerepe a makrofág differenciációban	59
ÖSSZEFOGLALÁS	63
SUMMARY.....	64
IRODALOMJEGYZÉK.....	65
TÁRGYSZAVAK.....	80
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	81
FÜGGELEK	82

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP γ S	adenozin-5'-O-(γ -tio)-trifoszfát
BSA	borjú szérum albumin
cAMP	ciklikus adenzin-5'-monofoszfát
CDK	ciklinfüggő kináz
Chk1	checkpoint kináz-1
CLA	kalikulin-A
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
DARPP-32	32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNR	daunorubicin
DTT	ditioteritol
E2F	eukarióta transzkripció faktor
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECIS	elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés
ECL	nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló reagens
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGCG	epigallokatechin-3-gallát
FBS	újszülött borjú szérum
GBPI	gasztrointesztinális és agyspecifikus PP1 inhibitor
HRP	torma-peroxidáz
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
ILK	integrinhez kötődő kináz
IP	immunprecipitáció
KEPI	kináz-aktivált PP1 inhibitor
LIMK1	LIM kináz-1
LIMK2	LIM kináz-2
LIMK2v1	LIM kináz-2 1-es izoformája
LB	Luria-Bertani tápoldat
M20	miozin foszfataáz 20 kDa regulátor alegység
MC-LR	mikrocisztin-LR
MDPK	Cdc42-kötő miotónikus disztrófia kináz
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MLC20	miozin 20 kDa könnyűlánc

MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MP	miozin foszfatáz
MYPT1	miozin foszfatáz regulátor alegység 1
NIPP-1	nukleáris protein foszfatáz inhibitor 1
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
OA	okadánsav
p21	ciklinfüggő kináz inhibitor-1
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PAK	p21-aktivált protein kináz
PARP-1	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PBS	foszfát puffer
PCNA	proliferáló sejtmagi antigén
PFA	paraformaldehid
PGG	penta-O-galloil-D-glükóz
PHI	PP1 holoenzim inhibitor
PHIN	PP1 holoenzim inhibitor domén
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PLK1	polo-szerű kináz-1
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PNUTS	nukleáris foszfatáz célrairányító alegység
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység
PP2A	protein foszfatáz-2A
PP2B	protein foszfatáz-2B
PP2C	protein foszfatáz-2C
PPM	fémion-függő protein foszfatázok
pRb	retinoblasztóma fehérje
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
RIPP-1	PP1 riboszomális inhibitor
ROCK	RhoA által aktivált kináz
RSK	p90 riboszomális S6 kináz
SDS	nátrium-dodecilszulfát
TBS	Tris-HCl puffer
TCA	triklór-ecetsav
THP-1	humán monocita leukémiás sejtvonal
VD ₃	D3-vitamin
ZIPK	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz

BEVEZETÉS

A fehérjék foszforilációja és defoszforilációja a sejtélettani folyamatok szabályozásának fontos mechanizmusa, melynek révén a módosított fehérje részvételével zajló jelátviteli pálya, illetve az ezen útvonalon keresztül szabályozott sejtfolyamat módosul. A fehérjék foszforilációjáért a protein kinázok, míg a defoszforilációért a protein foszfatázok felelősek, melyek szerin/treonin- vagy tirozin-specifikus, illetve kettős specificitású enzimek egyaránt lehetnek. A foszfatázok száma mintegy egyharmada a kinázokénak, ennek ellenére szerepük a fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában a kinázokéval egyenértékű. A foszfatázok alacsony számát a kisszámú katalitikus alegységhez kapcsolódó változatos szabályozó alegységek kompenzálják, melyek a holoenzim szubsztrátspecificitását és katalitikus aktivitását egyaránt befolyásolhatják.

A szerin/treonin-specifikus foszfatázok közül a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) kiemelt jelentőséggel bírnak, mivel a szerin/treonin oldalláncon foszforilált foszfofehérjék mintegy 90%-ának defoszforilációjáért felelősek (Fernandez és mtsai., 2002). Szerkezetüket tekintve 36-38 kDa méretű katalitikus, és egy vagy több regulátor alegységből épülnek fel. A holoenzimek szabályozása többféleképpen is megvalósulhat. A regulátor alegység adott sejtkompartmentbe, a megfelelő szubsztráthoz irányítja a katalitikus alegységet, és foszforilációja is befolyásolhatja a holoenzim aktivitását. Emellett a PP1 és PP2A enzimek szabályozásában bizonyos endogén inhibitor fehérjék, valamint egyes mikroorganizmusok által termelt membránpermeábilis inhibitor toxinok (mint például a kalikulin-A (CLA)) is részt vesznek, amelyek fontosak ezen enzimek sejtfunkciókban betöltött szerepének vizsgálatában. A PP1 és PP2A aktivitásának módosítására alkalmasak egyes növényi eredetű polifenol komponensek, az ún. tanninok is (Kiss és mtsai., 2013; Kónya és mtsai., 2019), melyek egyik legismertebb képviselője a zöld tea daganatellenes hatásáért elsődlegesen felelős epigallokatechin-3-gallát (EGCG) (Ahmad és mtsai., 1997; Britschgi és mtsai., 2010).

A PP1 gátló fehérjék általában kis molekulatömegű, hőstabil fehérjék, amelyek legtöbbje foszforiláció-függő, ésgátló hatásukat treonin oldalláncukon történő foszforilációt követően fejtik ki. Az elsőként felfedezett PP1 gátló fehérjék az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) voltak (Huang és Glinsmann 1976), melyek elsősorban a szabad katalitikus alegység gátlására képesek, ezzel szemben a 17 kDa PKC által aktivált inhibitor fehérje, a CPI-17 (Eto és mtsai., 1997) a PP1 típusú miozin foszfatáz (MP) holoenzim szelektív gátlására képes. Később több, a CPI-17-el nagyfokú

hasonlóságot mutató PP1 gátló fehérjét is leírtak, amelyek mindegyikében megtalálható egy ún. PP1 holoenzim inhibitor (PHIN) domén (Hayashi és mtsai., 2001). Ide tartoznak a kináz-aktivált PP1 inhibitor (KEPI) (Liu és mtsai., 2002), gasztrointesztinális és agyspecifikus PP1 inhibitor (GBPI) (Liu és mtsai., 2004), valamint a PP1 holoenzim inhibitor (PHI) (Eto és mtsai., 1999) fehérjék. A PHIN domén jelenlétét a LIM kináz fehérjecsaldba tartozó LIM kináz-2 egyik izoformájában (LIMK2v1) szintén kimutatták (Dubois és mtsai., 2003), azonban szerepét a PP1 szabályozásában eddig nem vizsgálták részletesen.

A kísérleteinkben modell enzimként használt MP a PP1 enzimcsalád tagja, amely egy PP1c δ katalitikus alegységből és egy miozinhoz kötődő regulátor alegységből (MYPT1) épül fel. Az enzim elsőként azonosított szubsztrátja a 20 kDa méretű miozin könnyű lánc (MLC20) volt, amelynek révén a MP a simaizom kontrakció szabályozásában kulcsszerepet játszik. Később kiderült, hogy az enzim szerepe messze túlmutat az aktomiozin komplex szabályozásán. Részt vesz többek között a génexpresszió szabályozásában, a neurotranszmitter kibocsátás és sebgyógyulás folyamatában, az erek tónusának szabályozásában, valamint a sejtciklus és proliferáció regulációjában egyaránt (Sipos és mtsai., 2017; Horváth és mtsai., 2018; Bátori és mtsai., 2017; Kiss és mtsai., 2019). Utóbbi funkcióját elsősorban a retinoblasztóma (pRb) és merlin tumorszupresszor szubsztrátok defoszforilációja révén fejt ki (Cho és mtsai., 2011; Jin és mtsai., 2006).

A daganatterápia egyik legjelentősebb problémája a daganatos sejtek kemorezisztenciájának kialakulása. Irodalmi adatok alapján a kemoterápiás ágensek közvetett módon fokozzák a PP1 és PP2A enzimek aktivitását (Yamamoto és mtsai., 1999), ami az apoptózis szabályozásában szerepet játszó fehérjék defoszforilációját eredményezi. A foszfatázok gátlása ezáltal elősegítheti a daganatos sejtek túlélését (Meeusen és mtsai., 2018). Ezzel kapcsolatban munkacsoportunk korábban kimutatta a daunorubicinnel (DNR) kombinációban alkalmazott egyes foszfatázgátló toxinok kemorezisztenciát fokozó hatását THP-1 leukémiás sejtekben (Dedinszki és mtsai., 2015; Kiss és mtsai., 2008). Ezzel szemben a protein foszfatázok aktiválása kedvezően befolyásolhatja a daganatos sejtek kemoszenzitivitását. A tumorszupresszor pRb és merlin fehérjék defoszforilációját katalizáló MP holoenzim aktiválása tehát alkalmas lehet a sejtek kemoszenzitivitásának fokozására.

Napjainkban egyre több tanulmány utal a foszfatázok lehetséges szerepére a makrofág differenciáció folyamatának szabályozásában is (Okamura, 2017; Kim, 2009; Smith és mtsai., 2018). A makrofágok az immunrendszer nélkülözhetetlen alkotói, melyek fő feladata a kórokozók és apoptotikus sejtek bekebelezése, de részt vesznek a gyulladásos folyamatok szabályozásában,

szövetek újraképzésében vagy a tumorok elleni védekezésben is. A makrofág differenciáció szabályozásának felborulása számos patológiás állapot kialakulásáért tehető felelőssé, mint például allergia, asztma, ateroszklerózis, de a tumorképződés folyamatában is szerepe lehet (Murray és Wynn, 2011). Nemrég bizonyították a RhoA/ROCK útvonal nélkülözhetetlen szerepét a forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) által indukált makrofág differenciációban (Yang és mtsai., 2017), azonban a ROCK (RhoA által aktivált kináz) szubsztrátjaként ismert MP részvételét a folyamatban eddig nem vizsgálták.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Reverzibilis fehérje foszforiláció/defoszforiláció

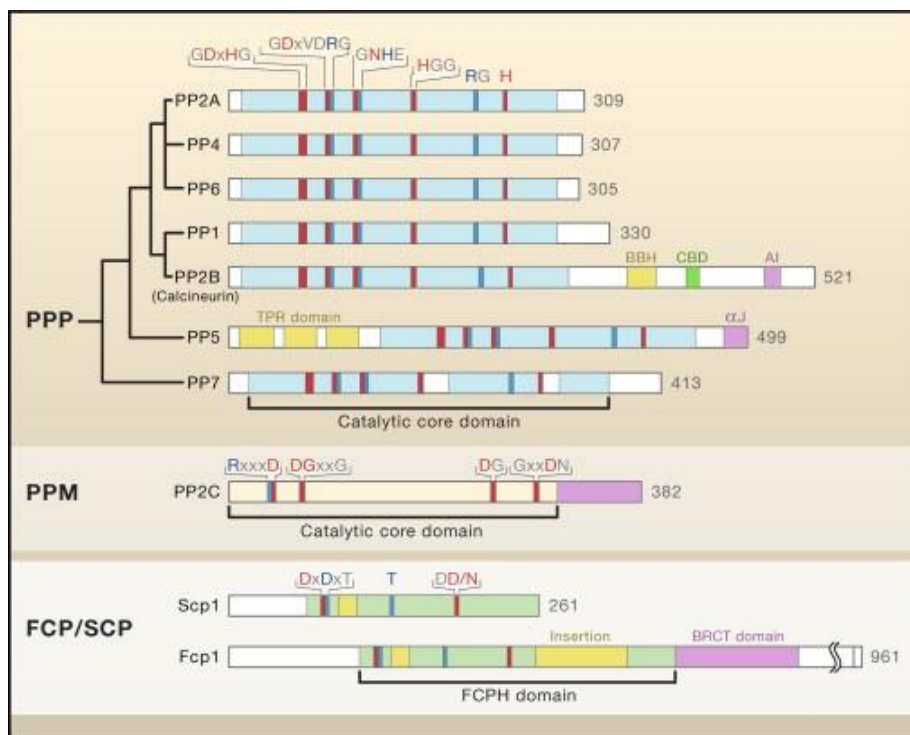
A protein kinázok és foszfatázok által katalizált reverzibilis fehérje foszforiláció egyike a leggyakoribb poszttranszlációs fehérjemódosításoknak, amely az eukarióta szervezetek fehérjéinek körülbelül egyharmadát érinti (Sefton és mtsai., 2001). A foszfátcsoport beépülését a protein kinázok katalizálják, amelyek az adenozin-5'-trifoszfát (ATP) terminális γ -foszfátcsoportját a fehérje szubsztrát szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncára helyezik át (Cohen és mtsai., 1990), míg a defoszforilációért a protein foszfatázok felelősek, melyek a foszfo-Ser/Thr és/vagy foszfo-Tyr aminosavmaradékok foszfo-észter kötéseit hidrolizálják (Shi, 2009). Fehérje foszforiláció/defoszforiláció révén szabályozódnak többek között az anyagcserefolyamatok, a transzkripció, a sejtciklus, a differenciáció, a sejtek közötti kommunikáció folyamata, a citoskeleton átrendeződése vagy az apoptózis is (Johnson és mtsai., 2009). A humán genom mintegy 500 protein kinázt kódol, ezek közel kétharmada Ser/Thr-specifikus kináz, amelyek a sejt szintű foszforilációs események 98%-áért felelősek (Peti és mtsai., 2013). Ezzel szemben a foszfatázok száma kevesebb mint egyharmada a kinázokénak (~150), melyek közül alig 40 a Ser/Thr-specifikus foszfatázok száma (Cohen, 2002).

1.2. A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok jellemzése és csoportosítása

A fehérjék foszforilációs szintjének kialakításában a Ser/Thr-specifikus foszfatázok szerepe a kinázokéval egyenértékű, katalitikus alegységeik korlátozott számát ugyanis ellensúlyozza, hogy számos szabályozó alegységgel társulhatnak, különböző aktivitású és szubsztrátspecifitású holoenzimeket alkotva ezáltal, így biztosítva specificitásukat a különböző biológiai funkcióik szabályozásában (Shi, 2009).

A Ser/Thr-specifikus foszfatázokat biokémiai tulajdonságaik szerint kezdetben két csoportra osztották: PP1 és PP2 típusú foszfatázok. A PP1 enzimek aktivitása inhibitor fehérjékkel (I-1, I-2), illetve heparinnal gátolható, míg a PP2 típusú foszfatázok aktivitását ezek az effektorok nem befolyásolják (Ingebritsen és Cohen, 1983; Gergely és mtsai., 1984).

Egy újabb besorolási rendszer szerint a Ser/Thr-specifikus foszfatázok három családot alkotnak: a foszfoprotein-foszfatázok (PPP-k), a fémion-függő foszfatázok (PPM-ek), valamint az aszpartát-függő foszfatázok (1. ábra – Shi, 2009).



1. ábra. A szerin/treonin-specifikus foszfatázok csoportosítása

A jellemző szekvencia-motívumok az egyes ábrák fölött jelölve (pirossal a fémion-, kékkel a foszfátkötésért felelős aminosavak). (Shi, 2009)

A PPP osztályon belül hét alosztályt különböztetnek meg: PP1, PP2A és PP2B (más néven calcineurin), melyek aktív helyükön $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ionokat tartalmaznak, illetve az ún. új típusú fehérjefoszfatázok, mint a PP4, PP5, PP6 és PP7. A PPM család tagjainak működéséhez további fémionok ($\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) nélkülözhetetlenek. Ide tartozik a Mg^{2+} -függő PP2C, valamint a piruvát-dehidrogenáz foszfatáz (Shi, 2009 és Cohen, 1997). Az aszpartát-függő foszfatázoknak mindössze két tagja van, az RNS-polimeráz II CTD foszfatáz TFIIIF-asszociáló komponense (FCP) és a kis CTD foszfatáz (SCP) (Shi, 2009 és Brautigan, 2013). Vizsgálataink elsősorban a PP1-re és a PP2A-ra, valamint a PP1 enzimesaládba tartozó miozin foszfatázra irányultak, ezért a továbbiakban ezek jellemző sajátosságait tekintem át.

1.2.1. A protein foszfatáz-1 szerkezete

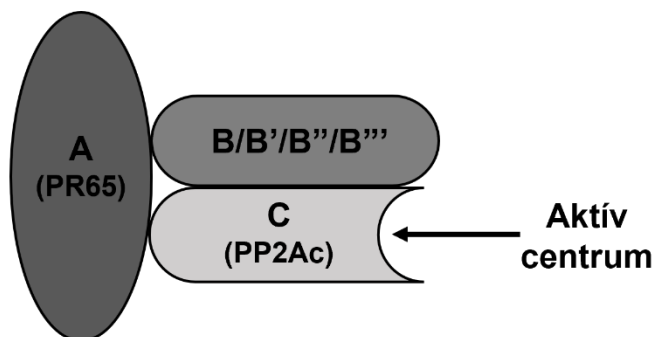
A PP1 valamennyi eddig vizsgált eukarióta sejtben expresszálódik, ami az élővilágban betöltött jelentős szerepére utal. Számos különböző sejt folyamatban vesz részt, mint pl. a sejtosztódás, glikogénmetabolizmus, fehérjeszintézis, citoskeleton szerveződés, vagy az apoptózis szabályozása (Ceulemans és Bollen, 2004).

A PP1 típusú enzimek 36-38 kDa méretű erősen konzervált katalitikus alegységből (PP1c), valamint számos különböző szabályozó alegység egyikéből épülnek fel, melyek a holoenzim szubsztrát-specifitására felelnek. A katalitikus alegységnek emlősökben ötféle splice-variánsa létezik: PP1 α 1, PP1 α 2, PP1 γ 1, PP1 γ 2 és PP1 β (más néven PP1 δ) (Butler és mtsai., 2013; Ceulemans és Bollen, 2004). A PP1 γ 2 izoformán kívül, amely a tesztiszben és az agyban expresszálódik, a többi izoforma általánosan megtalálható más szövetekben, sejten belüli lokalizációjuk azonban eltérő (Andreassen és mtsai., 1998). Az aktív centrum a katalitikus alegység N-terminális doméjának Y-alakú árkában helyezkedik el, ahol két fémion (Fe^{2+} és Mn^{2+}) is található, melyek elősegítik a szubsztrátmolekula foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét. Az aktív centrumok az egyes PP1c izoformákban nagyfokú hasonlóságot mutatnak (Shi, 2009). A katalitikus alegységek bár önmagukban is képesek a szubsztrátmolekulák defoszforilációjára, specifitásuk szabad formában meglehetősen széles. *In vivo* azonban a PP1c különböző szabályozó alegységekkel holoenzimet alkotva fordul elő, kiszélesítve ezáltal a szabályozási lehetőségeket.

1.2.2. A protein foszfatáz-2A szerkezete

A PP2A szerepét már számos igen fontos sejt folyamatban leírták. Részt vesz többek között a sejtproliferáció, apoptózis, sejtmotilitás vagy a sejtciklus szabályozásában is (Janssens és Goris, 2001). Meglehetősen sokrétű funkciói annak tulajdoníthatók, hogy – a PP1 enzimesaládhoz hasonlóan – a katalitikus alegység számos regulátor alegységgel kölcsönhatásba lépve alkot holoenzimet. Az enzim szerkezetét tekintve heterotrimerként funkcionál (2. ábra): egy 36 kDa méretű katalitikus C alegységből (PP2Ac), egy 65 kDa A szerkezeti alegységből (PR65), valamint egy ehhez kapcsolódó B alegységből épül fel. Az A és C alegységek alkotják az enzim alapvázát, míg a hozzá kapcsolódó valamely B alegységgel együtt jön létre a trimer holoenzim. Az A és C alegységeknek két izoformája (α és β) ismert (Kremmer és mtsai., 1997), míg a disszociálisan B alegységek 4 csoportba sorolhatók, melyek elnevezése igen változatos. Ide tartoznak a B (B55 vagy

PR55), B' (B56 vagy PR61), B'' (PR48/PR72/PR130) és a B''' (PR93/PR110) fehérjecsaldók, melyek mindegyikének 2-5 izoformája ismert, ezáltal számos heterotrimer holoenzimet alkothatnak (Xu és mtsai., 2006; Janssens és mtsai., 2008). A PP1c-től eltérően a PP2A alegységek, illetve szubsztrátok esetén PP2A kötőmotívumokat még nem azonosítottak (Slupe és mtsai., 2011).



2. ábra. PP2A szerkezeti felépítése

A (PR65): 65 kDa-os szerkezeti alegység; C: 36 kDa-os katalitikus alegység; B, B', B'', B''' regulátor alegységek

Az alegységek sokfélesége a PP2A holoenzimek közötti funkcionális különbségek jelenlétére, valamint az egyes alegység-kombinációk szubsztrátspecifitásban, illetve a katalitikus aktivitás modulálásában játszott szerepére utalhat (Kamibayashi és mtsai., 1994). A holoenzimek aktivitása mindemellett poszttranszlációs módosítások révén is szabályozható. A PP2Ac Tyr307 oldalláncának p60v-src kináz általi foszforilációja például az enzim aktivitását csökkenti (Chen és mtsai., 1992), a B' δ alegység Ser566 oldalláncának cAMP-függő protein kináz (PKA) általi foszforilációja a holoenzim aktivitását növeli (Ahn és mtsai., 2007), a B' α Ser41 oldalláncának protein kináz Ca (PKC α) általi foszforilációja pedig a holoenzim gátlását eredményezi (Kirchhefer és mtsai., 2014).

1.3. A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok szabályozása természetes vegyületekkel és inhibitor fehérjékkel

1.3.1. PP1 és PP2A gátlása toxinokkal és tanninokkal

A PP1 és PP2A enzimek gátlására a természetben számos, mikroorganizmusok által termelt membránpermeabilis toxin fordul elő. Jelenlétükben a sejtekben nagymértékben megemelkedett foszforilációs szintet figyelhetünk meg, emellett koncentráció-függő szelektív gátló hatásuknak köszönhetően elengedhetetlenül fontosak az egyes foszfatázok szerepének vizsgálatában *in vitro*, valamint élő sejtes rendszerekben egyaránt (MacKintosh és MacKintosh, 1994; Favre és mtsai.,

1997). Ilyen toxin például az okadánsav (OA), illetve a kalikulin-A (CLA), amelyek hatékonyabb gátlószerei a PP2A-nak, mint a PP1-nek. A tautomycin (TM) és származéka, a tautomicetin (TMC) hatékonyabban gátolják a PP1 aktivitását, mint a PP2A-t. A mikrocisztin-LR (MC-LR) egy heptapeptid, amely azonos mértékben és irreverzibilisen gátolja mindkét enzimet (Goldberg és mtsai., 1995).

Munkacsoportunk a PP1 és a PP2A gátlószereként azonosított több tannin típusú vegyületet, többek között a gallotannin típusú penta-O-galloil- β -D-glükózt (PGG), a katechin típusú epigallokatechin-3-gallátot (EGCG) (Kiss és mtsai, 2013), valamint az ellagitanninok számos képviselőjét (Kónya és mtsai, 2019). A tanninok növényi eredetű, vízben oldódó polifenol vegyületek, melyeknek különböző molekulatömegű és kémiai szerkezetű variánsai ismertek, de valamennyiükben megtalálható egy vagy több polihidroxi egység (leggyakrabban D-glükóz), amely(ek)hez észter kötéssel egy vagy több fenolos hidroxi csoportot tartalmazó gyűrűs molekula (galluszsav vagy egyéb polifenol gyűrű) kapcsolódik. Egyik legismertebb képviselőjük a zöld teában legnagyobb mennyiségben előforduló EGCG, amely elsődlegesen felelős annak daganatellenes hatásáért. Bár a tanninok az inhibitor toxinokhoz képest a PP1c kevésbé hatékony gátlószerei, sokkal kevésbé toxikusak, így kiváló kiindulási molekulái lehetnek új, szelektív PP1c-gátló gyógyszerek kifejlesztésének.

1.3.2. Protein foszfatáz-1 gátló fehérjék

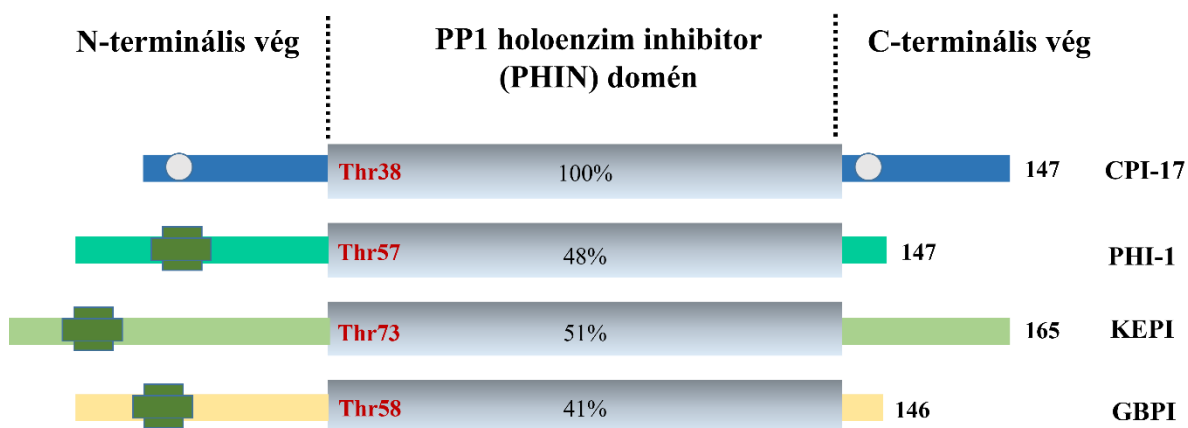
A sejtekben számos olyan protein foszfatáz inhibitor fehérje is termelődik, amelyek szubsztrátanalóggént viselkedve a katalitikus alegység aktív centrumának közelében kötődve gátolják annak aktivitását. Ezek általában kis molekulatömegű, hőstabil fehérjék, melyek legtöbbje foszforiláció-függő, vagyis gátló hatásukat treonin oldalláncukon történő foszforiláció révén fejtik ki (Goldberg és mtsai., 1995). Az elsőként felfedezett PP1 gátló fehérjék a szabad katalitikus alegységet gátló I-1 és az I-2 voltak. Amennyiben a PP1c egy holoenzim komplex része, ezen inhibitor fehérjék már csak kismértékben vagy egyáltalán nem képesek gátló hatásuk kifejtésére (Hubbard és Cohen, 1993). További PP1c gátló fehérjék a főként az agyban expresszálandó 32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein (DARPP-32) (Hemmings és mtsai., 1984), a nukleáris protein foszfatáz inhibitor (NIPP-1) (Jagilleo és mtsai., 1997) és a PP1 riboszomális inhibitor (RIPP-1) (Beullens és mtsai., 1996). Az I-1 és DARPP-32 fehérjéket elsősorban a PKA

foszforilálja és ezáltal aktiválja, míg az I-2 és NIPP-1 foszforilálatlan formában aktívak (Oliver és Shenolikar, 1998).

1.3.3. A CPI-17 fehérjecsalád és a LIMK2 fehérje

Az 1995-ben felfedezett CPI-17 egy 147 aminosavból álló fehérje, amely elsősorban simaizomban és az agyban expresszálódik és Thr38 oldalláncának PKC általi foszforilációja jelentősen növeli foszfatazgátló hatását. Ezen oldalláncának foszforilációjában később számos egyéb kináz szerepét is bizonyították: ROCK, integrinhez kötődő kináz (ILK), leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK) és a PKA is (Erdődi és mtsai. 2003; Huang és mtsai., 2006; Kitazawa és mtsai., 2000) foszforilálja ezt az oldalláncot. A foszforilált CPI-17 a PP1c katalitikus és MYPT1 regulátor alegységből felépülő miozin foszfataz enzim (MP) katalitikus alegységének aktív helyéhez kötődve szelektív módon képes a holoenzim gátlására (Eto és mtsai., 1995). Arra utaló adatok is vannak, hogy a CPI-17 az aktív centrum mellett a MYPT1-hez is kötődni képes, ami magyarázatot adhat a MP CPI-17 általi specifikus gátlására (Eto, 2009). A foszforilált CPI-17 képes más PP1 holoenzimekhez is kötődni, amelyek azonban defoszforilálhatják a CPI-17-t, semlegesítve annak gátló hatását, míg a MYPT1-hez társult PP1c nem képes eltávolítani a CPI-17 Thr38 oldalláncának foszfátcsoportját (Eto, 2009). A MP holoenzimhez való kötődésben a CPI-17 középső doménjének van szerepe, az itt található Tyr41 oldallánc pedig védi a fehérjét a MP általi defoszforilációval szemben (Hayashi és mtsai., 2001). Később más CPI-17-szerű fehérjéket is felfedeztek, amelyek mindegyike hordoz egy központi PP1 holoenzim inhibitor (PHIN) domént és rendelkeznek a Thr38-nak megfelelő foszforilációs hellyel is, azonban a MP-ra kifejtett gátló hatásuk tekintetében különböznek a CPI-17-től. A CPI-17-szerű fehérjecsaládba sorolt KEPI, PHI és GBPI fehérjék aktiváló foszforilációs helyét körülvevő szekvencia jellemző a CPI-17 családra és pseudo-palindrom jelleggel bír. E rokon fehérjékben a CPI-17-el ellentétben az N-terminálison PP1c-kötőmotívum is található (3. ábra), ezáltal foszforilálatlan formában is képesek a PP1c-hez kötődni (Eto, 2009).

A CPI-17 foszforilációs szekvenciájával végzett összehasonlító vizsgálatok alapján kiderült, hogy a LIM-kináz 2 fehérje egyik izoformája, a 75 kDa molekulatömegű LIMK2v1 szintén tartalmaz egy, a PHIN doménnel nagyfokú szekvencia azonosságot mutató szakaszt, valamint a Thr38 oldalláncnak megfelelő foszforilációs helyet (Thr596) (Dubois és mtsai., 2003).



3. ábra A CPI-17-szerű fehérjecsald tagjai (forrás: Eto és mtsai., 2009)

Az aktiváló foszforilációs hely a konzervált PHIN doménben található (pirossal jelölve). A szürke körök egyéb foszforilációs helyeket jelölnek. A PHI, KEPI és GBPI fehérjékben PP1c-kötő motívum is található (zölddel jelölve).

A LIM-kináz fehérjecsald tagjai szerin/treonin-, illetve tirozin-kinázok, melyek elsősorban a kofilin foszforilációja révén történő gátlása következtében döntő szerepet játszanak az aktin filamentumok és mikrotubulusok szerveződésének szabályozásában, ezáltal a citoskeleton átrendeződés folyamatában (Prunier és mtsai., 2017). A családnak mindössze két tagja van: a LIM-kináz 1 (LIMK1) és a LIM-kináz 2 (LIMK2), melyek szerkezetüket tekintve nagyfokú hasonlóságot mutatnak: az N-terminálison két LIM doménnel, egy középső PDZ doménnel és egy C-terminális kináz doménnel rendelkeznek. A LIMK2-nek három alternatív splice variánsa ismert (LIMK2a, LIMK2b és LIMK2v1) (Scott és Olson, 2007), melyek közül a LIMK2a és 2b előfordulása részletesebben feltárt. A LIMK2b izoforma N-terminálisa a LIMK2v1-el, míg C-terminálisa a LIMK2a-val azonos, a LIMK2a pedig mind az N- és C-terminálisát tekintve különbözik az 1-es variánstól. A LIMK2v1 előfordulása, funkciói alig ismertek, mRNS-szintű expressziójáról is néhány évvel ezelőttig mindössze egyetlen tanulmány számolt be (Croft és mtsai., 2011). Elsőként 2018-ban mutatták ki a LIMK2v1 fehérjeszintű expresszióját HEK-293 és HeLa sejtekben, illetve különböző szövetekben (máj, tüdő, hasnyálmirigy). Ugyanezen munkacsoport kimutatta azt is, hogy a LIMK2v1, bár rendelkezik kináz aktivitással, a LIM-kinázok hagyományos szubsztrátját, a kofilint mégsem foszforilálja közvetlenül, ehelyett a PP1c-vel kölcsönhatásba lépve gátolja annak a foszforilált kofilinnel szembeni aktivitását, hozzájárulva ezzel az aktin stresszkábelek képződéséhez. Ez az egyéb izoformáktól eltérő útvonalon lejátszódó szabályozási folyamat a foszfo-koofilin szint szoros kontrollálása révén lehetővé teszi a citoskeletonális átrendeződés sokrétű regulációját (Vallée és mtsai., 2018). A munkacsoport vizsgálatai nem terjedtek ki azonban a

LIMK2v1 Thr596 foszforilációjának a PP1 gátló hatásban betöltött szerepének tanulmányozására, ezért munkánk során többek között ezt a kérdést igyekeztünk feltárni.

1.4. A protein foszfatáz-1 szabályozása regulátor alegységekkel

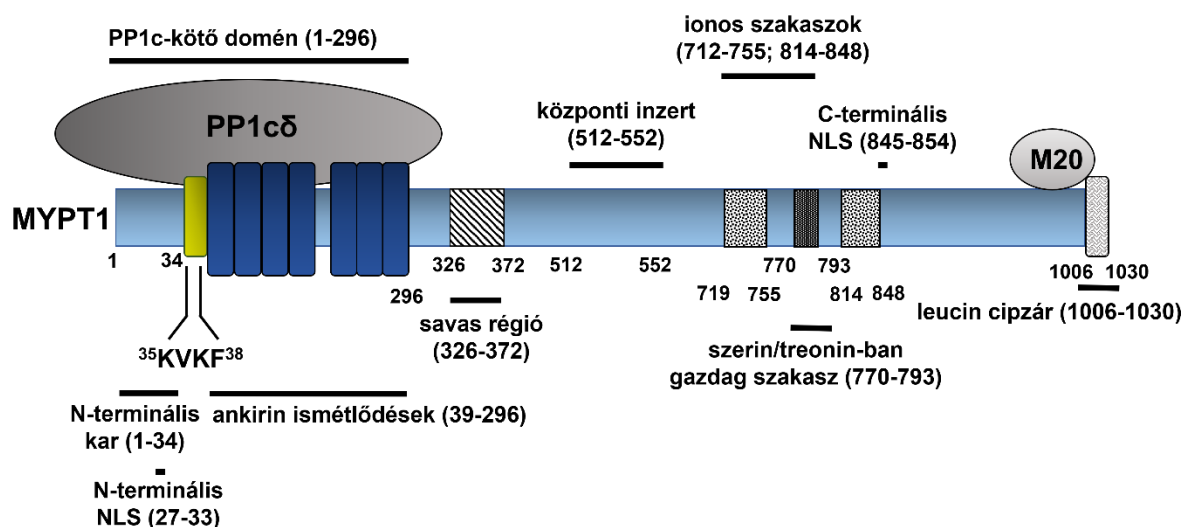
Az irodalomban több mint 200, a katalitikus alegységgel kölcsönható fehérje ismert, melyek között regulátor alegységek, inhibitor fehérjék és szubsztrátok is vannak. A PP1c a sejtekben szabad formában feltehetően nem, legfeljebb rövid ideig fordulhat elő, ehelyett különböző szabályozó alegységekhez kötődve, holoenzimként funkcionál, mely alegységek a holoenzimet a megfelelő szubsztráthoz, illetve sejtkompartmenthez irányítják. A regulátor alegységeket célpontjuk szerint csoportosítva megkülönböztethetünk többek között miozinhoz (MYPT1, MYPT2), glikogénhez (G_M, R5), citoskeletonhoz (spinoofilin, neurabin), splicoszómához/RNS-hez (NIPP, PNUTS) irányító regulátorokat (Tang és mtsai., 1991; Alessi és mtsai., 1992; Jagiello és mtsai., 1997). A szabályozó alegységek szekvenciájukat tekintve igen változatosak, ennek ellenére általában megtalálható bennük egy rövid, ún. RVxF motívum (K/R-x1-V/I-x2-F/W), amely a katalitikus alegységhez történő specifikus kötődésért felelős és jelenléte a kölcsönhatás kialakítása szempontjából nélkülözhetetlen (Egloff és mtsai., 1997). A kötőmotívum a PP1c aktív centrumától távol eső hidrofób zsebéhez kötődik (Egloff és mtsai., 1997), amely kölcsönhatást a motívumot megelőző bázikus aminosavak, a katalitikus alegység savas oldalláncai között kialakuló kapcsolatok és egyéb másodlagos kötőhelyek is erősíthetnek (Heroes és mtsai., 2013; Tóth és mtsai., 2000b). A továbbiakban a munkánk során elsődlegesen vizsgált MYPT1 regulátor alegységet tartalmazó miozin foszfatáz holoenzim sajátosságait tekintem át.

1.5. A miozin foszfatáz

1.5.1. A miozin foszfatáz alegységszerkezete

A miozin foszfatázt (MP) elsőként csirke zúzából izolálták heterotrimer holoenzimként, amely egy 38 kDa PP1cδ katalitikus alegységből, egy 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1), valamint egy eddig ismeretlen funkciójú 20 kDa alegységből (M20) áll (Alessi és mtsai., 1992). A MP fő tulajdonságai a PP1cδ és a MYPT1 alegységek komplexének tulajdoníthatók (Matsumura és Hartshorne, 2008), az M20 expresszióját sem az agyban, sem vázizomban nem tudták kimutatni (Moorhead és mtsai., 1998).

A MP működését elsősorban a MYPT1 regulátor alegység szabályozza, amely kölcsönhatást létesít a katalitikus alegység és a szubsztrátmolekula között. Ezen “célra irányító” funkciójára utal a MYPT1 elnevezés is (myosin phosphatase target subunit 1), de az irodalomban egyéb elnevezései is ismertek, mint például M110, MBS (myosin binding subunit) vagy M130/133. A humán MYPT1 a 12q15-q21 kromoszómán elhelyezkedő PPP1R12A gén terméke (Takahashi és mtsai., 1997), amely számos sejttípusban expresszálódik, de legnagyobb mennyiségben simaizom sejtekben fordul elő (Matsumura és Hartshorne, 2008). Alternatív splicing révén számos eltérő molekulatömegű (110-130 kDa) MYPT1 izoforma jöhet létre, melyek a középső inzert (512-552), illetve a C-terminális leucin cipzár (1006-1030) jelenléte/hiánya alapján különböztethetők meg egymástól (Hartshorne és mtsai., 2004; Dirksen és mtsai., 2000). A PP1c-kötő motívum, a KVKF szekvencia a MYPT1 izoformák N-terminális régiójában található, a 35-38 aminosavak között (Cohen PT, 2002), melyet két domén szegélyez: egy N-terminális kar, amely megelőzi a KVKF-motívumot (1-34 aminosavak) és az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó domének (8 ismétlődés, 39-296 aminosavak) (Terrak és mtsai., 2004). Két sejtmagi lokalizációs szignál (NLS) is található a MYPT1-en, egyik az N- (27-33 aminosavak), a másik a C-terminális részen (845-854) helyezkedik el, illetve elkülöníthető még egy savas oldalláncokban gazdag régió (326-372 aminosavak), egy-egy ún. ionos szakasz (719-755 illetve 814-848 aminosavak), egy Ser/Thr-ban gazdag szakasz (770-793 aminosavak), illetve a már említett középső inzert és leucin cipzár motívumok (4. ábra).



4. ábra A miozin foszfatáz holoenzim szerkezete (Forrás: Ito és mtsai., 2004)

A PP1c katalitikus alegységgel kialakított kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régiója fontos szerepet játszik, ezen belül is a már említett ³⁵KVVF³⁸-motívum kiemelkedő fontosságú. A

motívum a PP1c hat aminosavmaradékával (Ile169, Leu243, Phe257, Leu289, Cys291 és Phe293) kölcsönhatásba lép, melyek hidrofób barázdát képeznek, majd lehorgonyozza azt a MYPT1-hez anélkül, hogy befolyásolná annak katalitikus aktivitását (Hartshorne és mtsai., 2004). A motívum kapcsolódása további három, a kölcsönhatás stabilizálásában szerepet játszó MYPT1 szakasz kapcsolódását segíti elő: elsőként a MYPT1¹⁻²² régió kapcsolódása következik be, amely elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ szakasz, majd a savas MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ régiók kötődését (Tóth és mtsai., 2000b). Az említett kölcsönhatásokat a MYPT1¹⁻²⁹⁹ és PP1c δ komplex együttes kristályosítása és röntgenszerkezeti vizsgálata is bizonyította (Terrak és mtsai., 2004).

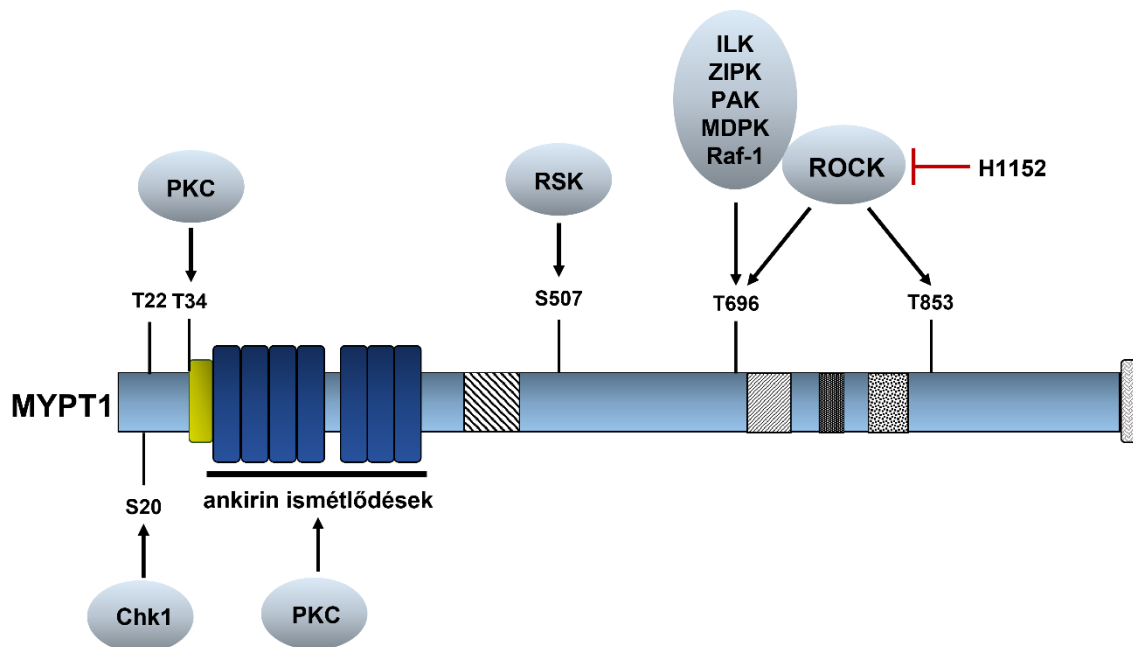
1.5.2. A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 foszforilációjával

A MP szabályozása létrejöhet mind a regulátor alegység foszforilációja, a holoenzim disszociációja, lokalizációjának változása, illetve az enzim inhibitor fehérjékkel történő gátlása révén is. A továbbiakban a regulátor alegység foszforilációjának lehetőségeit részletezem, amely gátló vagy aktiváló hatást egyaránt kiválthat.

A MYPT1 két fő gátló foszforilációs helye a Thr696 és Thr853 oldalláncok, melyeknek kiemelkedően fontos szerepük van a sejtek kontraktilitásának szabályozásában (Butler és mtsai., 2013). Elsőként a ROCK-t sikerült azonosítani a MYPT1 Thr696 foszforilációját katalizáló kinázként (Feng és mtsai., 1999), később azonban számos más kinázt, többek között az ILK-t (Kiss és mtsai., 2002; Murányi és mtsai., 2002), a ZIPK-t (Niiró és Ikebe, 2001), a p21-aktivált protein kinázt (PAK) (Takizawa és mtsai., 2002a), a MYPT1 kinázt (MacDonald és mtsai., 2001a), az izom disztrófia protein kinázt (MDPK) (Murányi és mtsai., 2001) és a Raf-1 kinázt (Broustas és mtsai., 2002) is azonosították (5. ábra). A ROCK a Thr853 oldallánc foszforilációját is katalizálni képes, amely feltehetően a MYPT1-miozin komplex disszociációjának elősegítése révén gátolja a holoenzim működését (Velasco és mtsai., 2002). A Thr696 és Thr853 gátló foszforilációs helyek körüli szekvencia nagyfokú hasonlóságot mutat a miozin könnyűlánc (MLC20) Ser19 foszforilációs helyének szekvenciájával, melynek révén a foszforilált MYPT1 a katalitikus alegység aktív centrumához kötődve csökkenti annak miozinhoz való affinitását (Khomorov és mtsai., 2009).

A PKC képes mind a Thr34 oldalláncon, mind az ankirinszerű régióban foszforilálni a MYPT1-et. Előbbi nincs hatással a holoenzim aktivitására, utóbbi következtében viszont csökken a MP alegységei közötti kölcsönhatás, valamint a holoenzim miozinnal szembeni aktivitása egyaránt (Tóth és mtsai., 2000a). Nemrégiben tömegspektrometriás módszerrel azonosítottak 21 új potenciális MYPT1 foszforilációs helyet, melyek közül hét (Ser20, Thr22, Thr453, Ser478, Thr671,

Ser678, Ser680) ezidáig ismeretlen volt (Chao és mtsai., 2012). A Ser20-as oldalláncról később bebizonyították, hogy foszforilációjáért a checkpoint-kináz-1 (Chk1) felelős, valamint, hogy foszforilációja a MYPT1-PP1c kötődése, ezáltal a katalitikus alegység szubsztrátokkal szembeni aktivitása szempontjából játszik szerepet (Hu és mtsai., 2018). Egy másik nemrégiben azonosított MYPT1 szabályozó foszforilációs hely a Ser507 oldallánc, amelyről kimutatták, hogy a p90 riboszómális S6 kináz (RSK) képes foszforilálni, amely elősegíti a ROCK kölcsönhatását a MYPT1-el, gátolva ezzel a MP holoenzim aktivitását (Samson és mtsai., 2019).



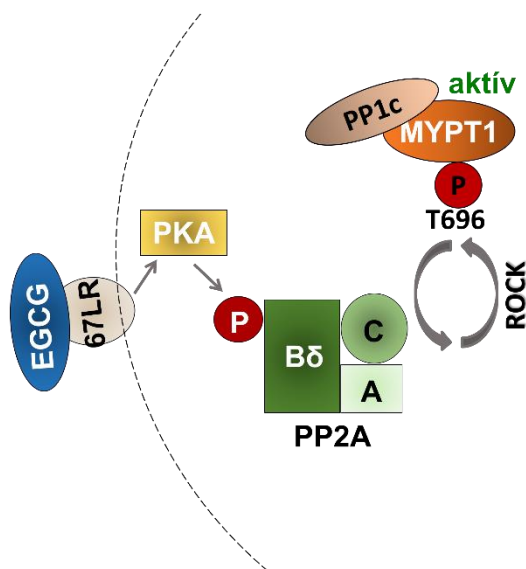
5. ábra A MYPT1 regulátor alegység szabályozása

A MYPT1 foszforilálódó Ser/Thr oldalláncai és az azokat foszforiláló kinázok (kékkel jelölve). A H1152 a ROCK specifikus inhibitora.

A MP aktiválásának folyamata kevésbé jól jellemzett, de ismert, hogy a ciklikus nukleotidok koncentrációjának növekedésével lehet összefüggésben (Wu és mtsai., 1996). A Ser695 és Ser852 oldalláncok a gátló Thr696 és Thr853 helyek közvetlen közelében találhatók és PKA, illetve protein kináz G (PKG) által foszforilálhatók (Wooldridge és mtsai., 2004). A Ser695 foszforilációja nincs közvetlen hatással a holoenzim aktivitására (Nakamura és mtsai., 1999), azonban megakadályozza a Thr696 ROCK általi további foszforilációját, kivédve ezzel a MP további gátlását (Wooldridge és mtsai., 2004). Később kimutatták a Ser852 foszforilációjának hasonló gátló hatását a Thr853 ROCK általi további foszforilációja tekintetében. A MYPT1 kettős foszforilációja a Ser695/Thr696, illetve a Ser852/Thr853 oldalláncokon szintén létrejöhet, amely azonban nem befolyásolja a MP aktivitását. Ezzel szemben azt is kimutatták, hogy a ROCK a Thr696 és Thr853 oldalláncok

foszforilációja révén akadályozza a PKA-t a szerin oldalláncok foszforilálásában. Ez az ellentmondás a kettős foszforiláció tekintetében feltehetően azzal magyarázható, hogy a szerin oldalláncok PKA általi foszforilációjának lehetősége a treonin monofoszforiláció mértékétől függ (Grassie és mtsai., 2012). A savas régióban található Thr435 és/vagy Ser432 oldalláncok cdc2 kináz révén történő foszforilációja fokozza a holoenzim affinitását a foszforilált miozin felé, növelve ezzel a MP aktivitását és elősegítve a stresszrostok felbomlását a profázis előtt (Totsukawa et al. 1999).

A MP aktiválása létrejöhet a regulátor alegység foszfo-Thr696 és -Thr853 oldalláncainak defoszforilációja révén is, amelyet a PP2A és a PP2B enzimek katalizálnak (Takizawa és mtsai, 2002; Kolozsvári és mtsai. 2012). A közelmúltban kimutatták, hogy a zöldtea polifenol EGCG a PP2A aktiválására képes, amit a MYPT1 Th696 oldalláncának defoszforilációja és ezáltal MP aktiválás követ (Umeda és mtsai., 2008) (6. ábra).



6. ábra A miozin foszfatáz aktiválása az EGCG/67LR/PKA/PP2A útvonalon keresztül.

Az EGCG a 67LR-en keresztül aktiválja a PKA-t, amely feltehetően a Bδ alegység foszforilációja révén aktiválja a PP2A-t, amely a MYPT1 Thr696 oldalláncának defoszforilációja révén a miozin foszfatáz aktivációját idézi elő. EGCG: epigallokatechin-3-gallát, 67LR: 67 kDa laminin receptor, PKA: protein kináz A, PP2A: protein foszfatáz-2A, A/Bδ/C: a PP2A szerkezeti/szabályozó/katalitikus alegysége, ROCK: RhoA-aktivált kináz, MYPT1: miozin foszfatáz regulátor alegység, PP1c: protein foszfatáz-1 katalitikus alegység.

Az EGCG kötődéséhez szükséges sejtfelszíni receptorként a 67 kDa laminin receptor (67LR), egy nem-integrin típusú laminin receptor funkcionál (Tachibana és mtsai., 2004), amely számos daganatos sejttípusban jelentős mértékben expresszálódik és kifejeződésének mértéke erősen korrelál a tumor inváziójának és metasztázisának kockázatával. A 67LR-en keresztül számos, a sejtprolifерáció és az apoptózis szabályozásában résztvevő jelátviteli útvonal aktiválódhat (Ménard és mtsai., 1997). Az EGCG apoptózist indukáló hatását számos tumoros sejtvonalban kimutatták,

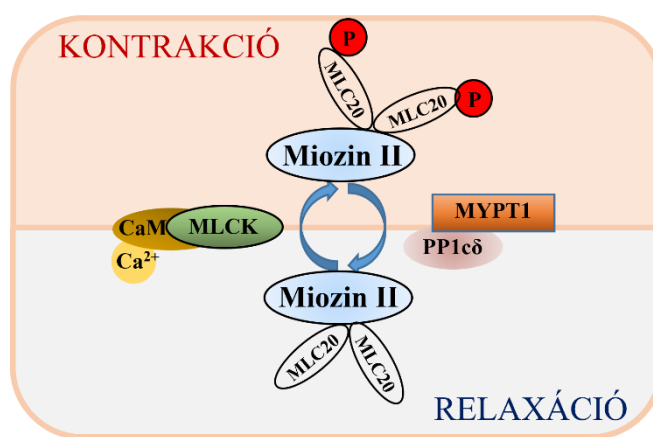
miközben az egészséges sejtekre nincs hatással (Ahmad és mtsai., 1997). Irodalmi adatok szerint antiproliferatív hatását részben protein kinázok szabályozása révén fejt ki (Qin és mtsai., 2008; Khan és mtsai., 2006), daganatellenes hatásának hátterében pedig részben a 67LR aktivációja áll (Umeda és mtsai., 2008, Negri, Nutrients, 2018). A PP2A aktivációját az EGCG a 67LR/adenilát cikláz/cAMP/PKA útvonalon keresztül váltja ki, amely onkoproteinek gátlásához és a tumorszupresszor merlin aktivációjához vezet (Tsukamoto és mtsai., 2014). Mivel a PKA a PP2A B56δ regulátor alegység Ser566 oldalláncának foszforilációja révén fokozza a PP2A aktivitását (Ahn és mtsai., 2007), ezért felmerül annak a lehetősége, hogy az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonalon keresztüli MP aktiváció szintén a PP2A-B56δ holoenzim aktivációja révén valósulhat meg, a B56δ részvételét azonban ezidáig nem bizonyították.

5.3. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepük

A kezdeti feltételezésekkel ellentétben a MYPT1 a simaizom sejtek mellett nem-izomsejtekben is megtalálható és szinte valamennyi szubcelluláris frakcióban előfordul. Kimutatták, hogy a citoskeletális folyamatokban való részvétele mellett a sejtciklus és sejtproliferáció, a génexpresszió, az embrionális fejlődés, a neurotranszmitter kibocsátás, illetve az endoteliális és epiteliális barrier funkció szabályozásában is részt vesz (Kiss és mtsai., 2019).

Az elsőként azonosított szubsztrátfehérje a MLC20 volt, amely foszforilált állapotában a MYPT1 ankirin ismétlődő régiójához kötődik, de a kölcsönhatásban a MYPT1 C-terminális szakaszai is szerepet játszanak (Ichikawa és mtsai., 1996a; Johnson és mtsai., 1997). A 20 kDa méretű MLC20 az izomkontrakció, a sejtosztódás, sejtmotilitás és a sejtek letapadásának szabályozásában nélkülözhetetlen miozin II fehérje alkotóeleme. A MLC20 foszforilációs állapota a Ca^{2+} /kalmodulin-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) és a MP működésének egyensúlyától függ (Ikebe és mtsai., 1985) (7. ábra). A MLC20 Ser19 oldalláncának elsősorban MLCK általi foszforilációja a miozin II aktin filamentumokhoz történő reverzibilis kötődése révén az aktomiozin komplex kontrakciójához vezet, míg a MP általi defoszforilációt izomrelaxáció követi (Chacko és mtsai., 1977; Ratz és mtsai., 2005). A MLC20 a Thr18-as oldalláncon is foszforilálható, amely feltehetően megakadályozza a Ser19 oldallánc defoszforilációját, amely a kontraktilis erő fenntartásához szükséges, azonban a Thr18 foszforilációja önmagában nem elegendő az összehúzóerő kiváltásához (Sutherland et al. 2012).

A MP-t az adducin foszforilációs állapotának szabályozójaként is azonosították (Kimura és mtsai., 1998), amely elsősorban a spektrin-aktin hálózat összeszereléséért felelős citoszkeletális fehérje (Kiang és Leung, 2018). Számos tanulmány bizonyította, hogy az ERM fehérjék defoszforilációját szintén a MP katalizálja. Az ERM fehérjecsaládba három, egymáshoz szerkezetileg igen hasonló fehérje, az ezrin, radixin és moezin tartoznak, melyeknek feladata a citoszkeleton és a membránfehérjék közötti kapcsolat megteremtése, ily módon részt vesznek mind a migrációs, sejtadhéziós, valamint a proliferációs folyamatokban (Fukata és mtsai., 1998; Kim és mtsai., 2012; Kovacs-Kasa és mtsai., 2016). A moezin a MYPT1 C-terminális régióihoz, míg az adducin az ankirinszerű ismétlődésekhez kötődik (Amano és mtsai., 2000).



7. ábra Simaizom kontrakció szabályozása

Ca²⁺-CaM: kalcium-kalmodulin komplex; MLCK: miozin könnyűlánc kináz; MLC20: miozin könnyűlánc; MYPT1: miozin foszfatáz regulátor alegység.

Az NF2 tumorsuppresszor gén termékéről, a merlinről is kiderült, hogy defoszforilációját az MP okozza, mely így aktivációját is eredményezi (Jin és mtsai., 2006). A merlin az ERM család fehérjéihez hasonló doménszerkezettel rendelkezik, de azokkal ellentétesen szabályozódik, azaz foszforilált formája inaktív, míg a defoszforilált merlin aktív és részt vesz a kontaktgátlásban, valamint a növekedés gátlásában. A MYPT1 a leucin cipzár doménjén keresztül kötődik a merlin alfa-hélix régiójának amino-terminális részéhez, amely régió nagyfokú hasonlóságot mutat a moezin MYPT1 kölcsönható régiójával. A MP-t a merlin Ser518 oldalláncának defoszforilációjában döntő szerepet játszó foszfatázként azonosították, amely a merlint a zárt konformációjában aktiválja. A MP specifikus inhibitora, a CPI-17 szintje számos daganattípusban emelkedett, ami a merlin tumorsuppresszor funkciójának elvesztéséhez vezet (Jin és mtsai., 2006). Daganatos sejtekben a MP gátlásáért felelős specifikus kinázként az ILK-t azonosították, amely a MYPT1 közvetlen

foszforilációja révén elősegíti a merlin inaktiválását, ezzel párhuzamosan a Hippo tumorsuppresszor útvonal gátlását, ami a növekedést elősegítő gének transzkripciójának aktiválásához vezet a YAP/TAZ/TEAD által közvetített módon (Serrano és mtsai., 2013).

A MP egyik legjelentősebb, a sejtciklusban fontos szerepet játszó kölcsönható fehérjéje a retinoblasztóma fehérje (pRb), egy tumorsuppresszor, amelynek szabályozása számos daganattípusban sérült. A pRb az E2F által közvetített gének transzkripciójának gátlása révén szabályozza a sejtciklust és a proliferációt. A pRb ciklinfüggő kinázok általi foszforilációja inaktiválja a fehérjét és elősegíti a sejtciklus végbemenetelét, míg a pRb defoszforilálásáért és aktiválásáért a PP1 és PP2A enzimek egyaránt felelősek lehetnek (Kolupaeva és Janssens 2013; Izawa és mtsai., 2000). Míg a PP2A közvetetten, a ciklinfüggő kinázok aktivitásának csökkentése révén járul hozzá a pRb csökkent foszforilációjához (Yan és Mumby, 1999), addig a PP1c közvetlenül is részt vehet a pRb több oldalláncának defoszforilációjában, melynek izoformái közül a PP1c δ bizonyult a leghatékonyabbnak (Liu és mtsai., 2006). Munkacsoportunk THP-1 leukémiás sejtekben a MP holoenzimet a pRb Thr826 oldalláncának defoszforilációjában részt vevő enzimként azonosította (Kiss és mtsai., 2008). A MYPT1-PP1c δ komplex a PP1c önmagában való alkalmazásához képest fokozta a foszforilált pRb-vel szembeni katalitikus aktivitást, ami alátámasztja a MYPT1 célirányító funkcióját a pRb defoszforilációja során. A MYPT1 N-terminális szakaszának a pRb C-terminális régiójához történő kötődését Far-Western technikával mutatták ki (Wu és mtsai., 2005), melyet munkacsoportunk felületi plazmonrezonanciás mérései is megerősítettek, továbbá a C-terminális MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ szakasz kötődését is bizonyították (Kiss és mtsai., 2008).

A MP a génexpresszió szabályozásában is többféleképpen részt vehet. A protein arginin metiltransferáz (PRMT5) enzimet, mint a MP új szubsztrátját azonosították, amely foszforilált formában a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációját katalizálja a hepatokarcinóma sejtek génexpressziós mintázatának jelentős megváltozását okozva, beleértve a retinoblasztóma és más tumorsuppresszor fehérjéket kódoló gének expresszióváltozását is (Sipos és mtsai., 2017). Ismert az is, hogy a MP révén történő defoszforiláció következtében a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) fehérje a sejtmagba transzlokálódik, ahol egyes gének (pl. *Nurr77*) átírásának szabályozásában vesz részt (Parra és mtsai., 2007).

A MP szerepét bizonyították továbbá a mitózis szabályozásában a polo-szerű kináz-1 (PLK1) defoszforilációja révén történő inaktiválása során (Chiyoda és mtsai., 2012), valamint az erek

tónusának szabályozásában az endotéliális nitrogén-oxid szintetáz (eNOS) defoszforilációja révén (Bátori és mtsai., 2017), sőt az enzim neuronális szubsztátjait is azonosították, köztük a szinapszin és szintaxin fehérjéket (Lontay és mtsai., 2004; Lontay és mtsai., 2012).

1.6. A protein foszfatáz-1 és a miozin foszfatáz szerepe leukémiában

A leukémia kemoterápiás kezelése során gyakran alkalmazott szerek (antraciklinek, pl. daunorubicin (DNR)) hatásmechanizmusa széleskörű és hosszútávú klinikai alkalmazásuk ellenére meglehetősen bizonytalan, háttérében feltehetően többféle komplex mechanizmus áll. A DNS-be interkalálódva számos makromolekula bioszintézisét, illetve a topoizomeráz II működését gátolhatják, szabadgyökök képződésének indukálása révén DNS károsodást idézhetnek elő, lipidperoxidációt indukálhatnak, akadályozhatják a DNS szálak szétválását vagy a helikáz enzim működését egyaránt (Gewirtz, 1999). Irodalmi adatokból ismert, hogy leukémiás megbetegedések esetén - ahogyan az más daganatos elváltozások során is általánosan jellemző - a kinázok és foszfatázok által katalizált foszforilációs-defoszforilációs folyamatok egyensúlya eltolódik, aktiválódhat vagy gátlódhat például a p42/44/Erk1/2 útvonal (Dent és Grant, 2001), amely a túlélésben és apoptózisban szerepet játszó fontos kináz kaszkád útvonal, vagy az Akt/PKB útvonal is, amely szintén a sejtek túlélésének illetve növekedésének fontos szabályozója (Martelli és mtsai., 2011). Mindemellett más munkacsoportok a PP1 és PP2A emelkedett aktivitását (Yamamoto és mtsai., 1999), valamint a tumorszupresszor pRb alacsony expresszióját és hiperfoszforilált állapotát írták le leukémiás sejtekben (Kornblau és mtsai., 1998). Munkacsoportunk a PP1-gátló tautomycin (TM) és a PP2A-gátló koncentrációban alkalmazott CLA hatását tanulmányozta THP-1 és KG-1 leukémiás sejtek DNR-el szembeni érzékenységre és azt találtuk, hogy bár a foszfatázgátló szerek önmagukban a sejtek életképességét csökkentették, DNR-el kombinációban alkalmazva azonban relatív túlélést elősegítő (védő) hatást gyakoroltak (Dedinszki és mtsai., 2015). Kimutattuk azt is, hogy az önmagában alkalmazott DNR kezelés hatására a pRb Thr826 oldalláncának foszforilációja csökkent, ezzel szemben CLA-val kombinációban alkalmazva emelkedett pRb foszforilációt detektáltunk (Kiss és mtsai., 2008), ami az E2F transzkripciós faktor kötődésének szabályozása révén a daganatos sejtek túlélését segíti elő (Rubin és Mittnacht, 2001). Munkacsoportunk kimutatta, hogy THP-1 sejtekben a pRb-foszfatáz aktivitás több mint 50%-a a MP holoenzimnek tulajdonítható (Kiss és mtsai., 2008), valamint az is ismert, hogy a MP a Thr826 mellett a pRb Ser807/811 oldalláncainak defoszforilációját is katalizálni képes, amely az E2F target gének és a sejtciklus

gátlásában nyilvánult meg (Cho és mtsai., 2011; Grey és mtsai., 2018). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a foszfatázok szerepének feltárása a kemoterápia vonatkozásában kiemelt jelentőséggel bírhat, mivel ezen enzimek a kemoterápia új célpontjaivá válhatnak. Mindezek alapján munkánk során vizsgálni kívántuk a MP EGCG révén történő aktiválásának hatását a daganatos sejtek proliferációjára és kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységre.

1.7. A protein foszfatáz-1 szerepe makrofág differenciációban

A monociták és a belőlük származó makrofágok az immunrendszer alkotóiként nélkülözhetetlen szerepet játszanak az immunválasz kialakulásának folyamatában. Legfontosabb feladataik közé tartozik többek között a vírusok, baktériumok, apoptotikus sejtek felismerése és bekebelezése, emellett az általuk termelt különböző enzimek, citokinek révén számos egyéb folyamatban is részt vesznek, pl. gyulladás, tumorok elleni védekezés, szövetek újraképzése vagy az immunsejtek funkcióinak szabályozása. A legújabb adatok szerint a monociták nemcsak a veleszületett immunrendszer működésében játszanak döntő szerepet, hanem számos betegség patogeneziséhez is hozzájárulnak, mint a májfibrózis, ateroszklerózis, szklerózis multiplex vagy az áttétek képződése tumoros megbetegedések esetén (Karlmark és mtsai., 2012). A monociták makrofágokká történő differenciációját kiváltó ingerek már régóta ismertek (Italiani és Boraschi, 2014; Ushach és Zlotnik, 2016). A kolóniastimuláló faktor (M-CSF) és az interleukin (IL)-34 részt vesznek a monocita/makrofág differenciáció homeosztatisz szabályozásában, míg a granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) a gyulladásos fenotípus felé történő differenciáció elősegítésében játszik kulcsfontosságú szerepet (Ushach és Zlotnik, 2016; Burgess és Metcalf, 1980). Azt is kimutatták, hogy a kemokin CXCL12 a RUNX3 transzkripciós faktor expressziójának szabályozása révén befolyásolja a monociták makrofágokká történő differenciálódását (Sanchez, 2011). A differenciáció szabályozásának megértése kulcsfontosságú többek között az ateroszklerózis mechanizmusának feltárásához. Továbbra sem ismert azonban, hogy a folyamat kordában tartása érdekében hogyan történik az intracelluláris jelátviteli útvonalak szabályozása.

A protein foszfatázok ideális jelöltek lehetnek e feladat ellátására, ugyanis bár számuk meglehetősen kevés, de a különböző regulátor alegységekkel alkotott komplexek variabilitása következtében számos fehérjét vagy jelátviteli útvonalat célozhatnak. Korábban már kimutatták, hogy HL-60 humán leukémiás sejtek D3-vitamin (VD₃)-indukált differenciációja során a PP1 aktivitása a citoszolikus frakcióban csökkent, ezzel párhuzamosan a membrán- és sejtmagi

frakciókban nőtt, a CLA kezelés pedig fokozta a sejtek differenciációját (Omay és mtsai., 1995). Ez arra utal, hogy a PP1 és PP2A enzimek szerepet játszhatnak a VD₃-indukált makrofág differenciáció szabályozásában. A PP2A negatív regulátorként történő részvételét az oszteoblasztok és adipociták differenciációjának szabályozásában szintén kimutatták már (Okamura, 2017; Kim, 2009). Az is ismert, hogy a Mg²⁺/Mn²⁺-függő protein foszfatáz-1A (PPM1A) a makrofágokban mind a vírusfertőzésekre (HIV), mind az intracelluláris *Mycobacterium tuberculosis* baktériummal való fertőzésre adott veleszületett sejtes immunválaszban ellenőrző pontként működik (Schaaf, 2017; Sun, 2016), valamint fokozott expressziója a differenciáció kezdetén a sejtek letapadását, és a gyulladásos citokinek termelését gátolja, valamint a gyulladásos (M1) makrofág-specifikus markerek kifejeződését csökkenti (Smith és mtsai., 2018). Egy újabb tanulmányban a RhoA/ROCK jelátviteli útvonal szerepét vizsgálták U937 humán limfóma eredetű sejtek PMA-indukált makrofág differenciációjában, és azt találták, hogy PMA kezelés hatására a ROCK1 és ROCK2 expressziója jelentősen emelkedett, ezzel párhuzamosan a MYPT1 Thr853 foszforilációs szintje is megnőtt, a RhoA/ROCK útvonal komponenseinek csendesítése pedig jelentősen gátolt makrofág differenciációban nyilvánult meg (Yang és mtsai., 2017), ami arra utal, hogy ez az útvonal fontos szerepet játszhat a makrofág differenciáció szabályozásában. Nem vizsgálták azonban a RhoA/ROCK útvonal egyik végrehajtó enzimeként funkcionáló MP (Amano és mtsai., 2010) szerepét a PMA-indukált makrofág differenciáció folyamatában, ezért munkánk során többek között ezen útvonal részletesebb vizsgálatát tűztük ki célul.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Számos vizsgálat irányul a fehérje foszforiláció mértékének a sejtek jelátviteli folyamataiban betöltött szerepére, ennek ellenére a kérdés még nem minden részletében tisztázott. A PP1 típusú enzimek valamennyi eukarióta sejtben expresszálódnak és számos fehérjét defoszforilálnak, ezáltal szabályozásuk részletes megismerése révén lehetőség nyílik az ezen fehérjék részvételével zajló jelátviteli utak pontosabb megértésére. A PP1 szabályozásának egyik lehetséges mechanizmusa az inhibitor fehérjék révén történő gátlás. A LIMK2v1 a már ismert CPI-17-szerű fehérjékhez hasonlóan tartalmaz egy PP1-gátló szakaszt, a gátlás pontos mechanizmusa azonban nem tisztázott, ezért célul tűztük ki ennek részletesebb vizsgálatát. A munkánk során modell enzimként használt PP1 családba tartozó MP különféle sejt folyamatokban játszott szerepét és szabályozását már széleskörűen vizsgálták, ennek ellenére részvétele a kemoszenzitivitás és makrofág differenciáció szabályozásában még nem teljesen tisztázott. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a MP THP-1 leukémiás sejtekben a pRb foszforilációs állapotát jelentősen befolyásolja és a CLA-val kombinációban alkalmazott DNR kezelés a sejtek kemoterápiás szerrel szembeni érzékenységét csökkenti (Kiss és mtsai., 2008). Ezek alapján vizsgálni kívántuk a MP aktiválásának hatását a daganatos sejtek kemoterápiás szerrel szembeni érzékenységére. A makrofág differenciációt kiváltó ingerek szintén régóta ismertek, azonban pontos szabályozási mechanizmusa még nem tisztázott. Egy friss tanulmány a RhoA/ROCK jelátviteli útvonal szerepére utal a folyamat szabályozásában (Yang és mtsai., 2017), ezért felmerült a kérdés, hogy a MP aktiválása révén befolyásolható-e a makrofág differenciáció folyamata.

Mindezek alapján munkánk legfőbb célkitűzései az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

1. A LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata, illetve az ahhoz feltehetően szükséges foszforilálódó oldallánc azonosítása.
2. Az EGCG révén történő MP aktiválás hatásának tanulmányozása az enzim tumorszupresszor szubsztrátjainak, a pRb és merlin fehérjék foszforilációs állapotára, valamint az EGCG-vel kombinált DNR kezelés hatásának vizsgálata THP-1 leukémiás sejtek DNR-el szembeni érzékenységére, a sejtek proliferációs képességére és a sejthalál mértékére.
3. A MP expressziójának és a regulátor alegység foszforilációs szintjének vizsgálata THP-1 sejtek VD₃- illetve PMA-indukált makrofág differenciációja során. A MP hatásának vizsgálata a differenciálódó makrofágok proliferációs- és letapadási képességére.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

A kísérletekhez az alábbiakban megjelölt anyagokat és vegyszereket használtuk:

SigmaFast proteáz inhibitor koktél tabletta, resazurin, szulforodamin B, PMA, $1\alpha,25$ -dihidroxi- D_3 -vitamin (kalcitriol, VD_3), daunorubicin, polietilénimin (PEI), ATP, ATP- γ -S, Coomassie Brilliant Blue R-250, ROCK II (Merck); BCA fehérjemeghatározó kit, nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagens, Zeba Spin sómentesítő oszlop (Thermo Fischer Scientific); DAPI (Molecular Probes); Penicillin/Streptomycin oldat, L-glutamin oldat, tripszin, borjúsérum albumin (BSA), RPMI tápoldat (Lonza); EGCG, H1152, GF109203X, Gö6983 (Tocris); Dual Color fehérje molekulatömeg standard; nitrocellulóz membrán ($0,45\text{ }\mu\text{m}$ pórusméret) (BioRad); kalikulin-A (CLA) (Santa Cruz Biotechnology); E.Z.N.A. Plazmid Maxi Kit (VWR); natív PKC, NotI (Promega); Protein A Sepharose (GE Healthcare); [γ - ^{32}P] ATP (Izotóp Intézet Kft.); QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent); Flag-LIMK2 plazmid (GeneCopoeia); mikrocisztin-LR (MC-LR) (Máthé Cs., Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biológiai és Ökológiai Intézet, Növénytani Tanszék).

Minden más vegyszer a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb tisztaságú volt.

3.2. Antitestek

A kereskedelmi forgalomból származó antitesteket a gyártók útmutatásainak megfelelően alkalmaztuk, az egyéb forrásból származó antitesteket pedig a feltüntetett irodalmi hivatkozásokban leírtak alapján használtuk.

Anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (Lontay és mtsai., 2004); anti-MYPT1^{pT696}, anti-MYPT1^{pT853} és PP2A-B56 δ , anti-retinoblastoma^{pT826}, anti-Flag, HRP-konjugált anti-nyúl IgG, HRP-konjugált anti-egér IgG (Merck); anti-MLC20^{pS19}, anti-merlin^{pS518}, anti-p21, anti-PCNA és anti-cPARP (Cell Signalling Technology); anti-PP1 β , anti-CD11b, tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-aktin (Santa Cruz Biotechnology); anti-67 kDa laminin receptor (Abcam); Alexa488 anti-nyúl IgG (Molecular Probes); anti-CPI-17^{pT38} (Masumi Eto, Sidney Kimmel Medical College, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania).

3.3. Sejtenyésztés

A kísérletekhez a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC) származó humán monocita leukémiás sejtvonalat (THP-1), valamint humán embrionális vese sejteket (tsA201) használtunk, amelyek tenyésztése 37°C-on, 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében történt. A szuszpenziós THP-1 sejtvonalat RPMI, míg a tsA201 sejteket DMEM tápfolyadékban tartottuk, amelyeket 10 % FBS-el, 2 mM L-glutaminnal és 100 U/ml penicillin/streptomycin-el egészítettünk ki.

3.4. THP-1 sejtek kezelése és lízise

A kemoterápiás ágenssel történő kezelést megelőző nap a sejteket friss médiumban vettük fel 2,5×10⁵ sejt/ml koncentrációban. A kezelés 1% FBS-t tartalmazó RPMI oldatban történt, 5×10⁵ sejt/ml sejtsűrűség mellett. A különböző koncentrációjú DNR kezeléseket 3, 24 vagy 48 órán át alkalmaztuk önmagában vagy 5 µM EGCG-vel 1 órán át tartó előkezeléssel kombinálva.

A makrofág differenciációs kísérleteket 10 % FBS-t tartalmazó RPMI médiumban 5×10⁵ sejt/ml sejtsűrűség mellett végeztük. A sejteket 24, 48 vagy 72 órán át tartó 100 nM PMA (Dreskin és mtsai., 2001) illetve 100 nM VD₃ kezelésnek (Daigneault és mtsai., 2010) vetettük alá önmagában illetve 20 µM EGCG-vel (1 óra) vagy 10 µM H1152-vel (30 perc) történő előkezeléssel kombinálva.

A kezelések végén az úszó sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (800 g, 3 perc), a letapadó sejtekről pedig a médiumot eltávolítottuk, és a sejteket jéghideg PBS-el mostuk. A sejtek feltárását RIPA pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0,25% Na-deoxikolát, 2 mM EDTA frissen kiegészítve proteázgátló koktél (2 mM AEBSF, 1 µM foszforamidon, 130 µM bestatin, 14 µM E-64, 1 µM leupeptin, 0,2 µM aprotinin, 10 µM pepstatin-A), foszfatázgátló koktél (50 mM NaF, 50 mM Na₄P₂O₇, 50 mM β-glicerofoszfát, 50 mM Na₃VO₄) ill. 1 µM mikrocisztinnel (MC-LR)) végeztük, jégen történő felkaparást követően 10 percig ultrahangos vízfürdőben szonikáltuk, majd a sejtörmelék eltávolítása céljából centrifugálást (16 000 g, 10 perc, 4°C) végeztünk. A felülúszót tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk és 5 x SDS mintapuffer (50% glicerin, 25% merkaptotanol, 2% SDS, 312,5 mM Tris pH 6,8) hozzáadása után 100 °C-on 5 percig főztük.

A teljes sejtlizátumok fehérjekoncentrációinak meghatározásához BCA reagenst használtunk, melyhez standardként marha szérum albumint (BSA) alkalmaztunk és a lizátumokat 1:10 arányban hígítottuk. Az oldatok abszorbanciáját 96-lyukú lemezen 590 nm-en Multiplate Reader (Multiscan

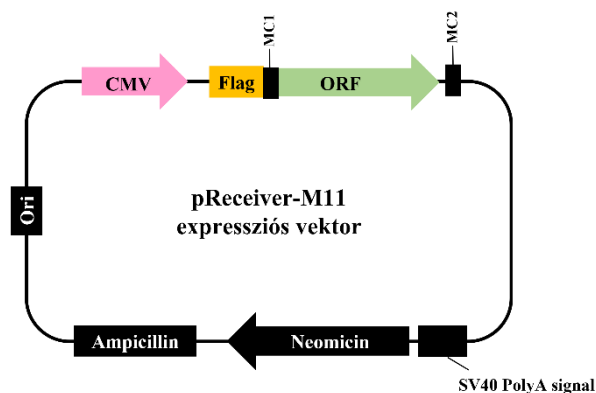
Go, Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. Az adatokat GraphPad Prism szoftverrel analizáltuk lineáris regressziót alkalmazva.

3.5. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot

A fehérjék analíziséhez a lizátumokat (30 µg fehérje/minta) denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el Laemmli módszerét alkalmazva (Laemmli, 1970) Bio-Rad MiniProtein készülék segítségével (200 V), majd nitrocellulóz membránra blotoltuk (100 V, 60 perc) Bio-Rad Criterion Blotter készülékkel. A membrán indifferens fehérjékkel történő blokkolásához, valamint az első és második antitestek hígításához 3% BSA-t és 0,05 % Tween-20-t tartalmazó PBS oldatot használtunk. A blokkolást követően a membránokat 0,05% Tween-20-t tartalmazó PBS-el mostuk, majd elsődleges antitesttel inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. Újabb mosási lépéseket követően a membránokat HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten másfél órán át, végül az immunreakciókat nagy érzékenységgű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagenssel detektáltuk. A foszforilációs hely(ek)re specifikus antitestek esetén PBS puffer helyett TBS puffert használtunk, amelyben a foszfátot 25 mM Tris-HCl helyettesítette.

3.6. A Flag-LIMK2v1 vektor

Az N-terminális Flag-taggel jelölt LIMK2 fehérje 1-es izoformájának (NM_001031801.1) emlős sejtekben történő túltermeltetéséhez a pReceiver-M11/Flag-LIMK2v1 (katalógusszám: EX-Z0703-M11) vektort használtuk (GeneCopoeia) (8. ábra).



8. ábra A Flag-LIMK2v1 vektor.

A Flag-LIMK2-t kódoló szekvenciát az ORF jelzi.

Az overexpresszált LIMK2v1 fehérje Western blottal történő detektálását, illetve affinitás tisztítását a vektorban található Flag-taget kódoló szekvencia tette lehetővé. A plazmidot *E.coli* JM109 kompetens sejtekbe transzformáltuk és ampicillin tartalmú LB agaron tenyésztettük, majd az így felnőtt egyedi telepeket 100 µg/ml ampicillin tartalmú folyékony LB tápoldatba (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0) oltottuk le és 37°C-on, 180 rpm-en egy éjszakán át történő rázatás mellett növesztettük. A plazmidot E.Z.N.A. Plazmid Maxi Kit segítségével tisztítottuk, a vektor méretét pedig NotI restrikciós enzimmel történő hasítást követően 0,5%-os agaróz gélen ellenőriztük.

3.7. Irányított mutagenézis

A Flag-LIMK2v1 Thr596 oldalláncán bekövetkező foszforiláció vizsgálata céljából az 596 oldalláncon lévő treonint nem foszforilálható alaninra, illetve a foszforiláció mimkálása érdekében glutamátra cseréltük (Steven és mtsai., 2007). A pontmutációkat QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) segítségével hoztuk létre a gyártó utasításai szerint, 50 ng plazmid templátot használva. A mutagenézishez használt primerek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. A PCR reakciót követően a templát DNS-t DpnI enzimmel emésztettük (37°C-on 1 órán át), majd XL-10 Gold ultrakompetens sejtekbe transzformáltuk és 100 µg/ml ampicillin-tartalmú szilárd LB lemezre szélesztettük, a másnapra felnőtt egyedi telepeket pedig az előző részben leírtak szerint növesztettük, majd a plazmidot tisztítottuk és a méretét agaróz gélen ellenőriztük. A mutáns plazmidok szekvenciájának ellenőrzését Sanger-féle DNS szekvenálással az UD GenoMed Kft. végezte. A kapott eredményeket a Chromas v2.6, valamint a Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) szoftverek segítségével validáltuk.

Flag-LIMK2 mutáns	Forward primer (5' – 3')	Reverz primer (5' – 3')
Flag-LIMK2^{T596A}	GGTCATACTTGATGGCGACCTTCC CTTGGCG	CGCCAAGGGAAGGTCGCCATCAAGT ATGACC
Flag-LIMK2^{T596E}	CCTTGGGGTCATACTTGATTTCGA CCTTCCCTTGGCGCCTC	GAGGCGCCAAGGGAAGGTCGAAATC AAGTATGACCCCAAGG

1. táblázat Flag-LIMK2v1 mutagenézishez használt primerpárok

3.8. Flag-LIMK2v1 transzfekció

A Flag-LIMK2v1 fehérje túltermeltetéséhez a tsA201 sejteket a transzfekciót megelőző napon sejttenyésztő lemezekre raktuk ki és a felületet másnapra 70-80 %-ban benövő sejtekbe pReceiver-M11/Flag-LIMK2v1 plazmidot juttattunk polietilénimin (PEI) transzfekciós reagens segítségével. A transzfekciós mix összeállításához 1 µg DNS:2 µl PEI arányt alkalmaztunk, amelyet steril 150 mM NaCl oldatban hígítottunk, majd 5 perc inkubációt követően a hígított PEI-t a DNS oldathoz adtuk. 30 perc elteltével a transzfekciós mixet a szérums- és antibiotikummentes DMEM tápoldatban lévő sejtekhez csepegtettük. 6 óra múlva a transzfekciós médiumot 20% FBS-t tartalmazó DMEM-el egészítettük ki, 10% FBS végkoncentrációt alkalmazva. 36 óra poszttranszfekciós idő után a médiumot szérumsmentes DMEM-re cseréltük és a sejteket egy éjszakán át (16 óra) éhezettük. 48 óra poszttranszfekciós idő után a sejteket 5 µM GF109203X-vel, 200 nM Gö6983-al vagy 10 µM H1152-vel kezeltük 30 percen át, majd 50 nM CLA-t hozzáadva további 30 percig inkubáltuk. A sejtek lízisét követően az overexpresszió sikerességét Western blot módszerrel, Flag-tag elleni antitest alkalmazásával ellenőriztük.

3.9. Immunprecipitáció

A Flag-LIMK2v1-t termelő tsA201 sejteket Na-deoxikolat-mentes RIPA pufferben lizáltuk a THP-1 sejtek kezelése és lízise részben leírtak szerint, majd a lizátumot Protein A Sepharose gyantán előtisztítottuk. Ehhez 15 mg Protein A Sepharose-t 500 µl TBS-ben 5 percig duzzasztottunk, majd háromszori mosást és centrifugálást (1500 g, 5 perc) követően 10 µg normál (nem-immun) egér szérumsot tartalmazó TBS pufferben 1 órán át 4°C-on forgatva inkubáltuk, végül TBS pufferrel ismét háromszor mostuk. Ezt követően adtuk hozzá a sejt-lizátumot, amellyel 2 órán át 4°C-on forgatva inkubáltuk, majd az ily módon előtisztított lizátumot a Flag taggel rendelkező fehérjék kikötésére alkalmas anti-Flag M2 affinitás gyantához adtuk. A gyanta 50%-os glicerines oldatából mintánként 30 µl-t vettünk ki, majd centrifugálást követően (8000 g, 30 másodperc) a glicerint eltávolítottuk, így mintánként 15 µl Flag gyantát használtunk (10 cm Petri csésze, 750 µl pufferben feltárva). A gyöngyöket 500 µl TBS-el háromszor mostuk, majd a lizátummal együtt 2 órán át 4°C-on, a csövek folyamatos forgatása mellett inkubáltuk. Centrifugálást követően (8000 g, 30 másodperc) a nem kötődött lizátumot pipettával leszívtuk, mintát vettünk belőle és SDS mintapufferrel felfőztük. A gyöngyöket ismét háromszor mostuk TBS-el, miközben a mosóoldatokból is mintát vettünk, majd

azokat szintén felfőztünk. A gyantához kötött fehérjét ezt követően a további felhasználás céljától függően kezeltük.

3.10. *In vitro* fehérje foszforiláció

A tsA201 sejtekben termeltetett Flag-LIMK2v1 fehérje *in vitro* foszforilációját PKC, illetve ROCK enzimekkel a gyártó utasításai szerint, anti-Flag M2 affinitás gyantán immobilizált fehérjével végeztük. A PKC általi foszforilációt 0,1 µg/ml enzimet alkalmazva Hepes tartalmú pufferben [20 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT] 0,65 mM CaCl₂, 1 µM MC-LR, 0,2 mM ATP, valamint foszfatidil-szerin-diolen micellák (0,3 mg/ml foszfatidil-szerin, 60 µg/ml diolein) jelenlétében végeztük 30°C-on. A ROCK általi foszforilációhoz 2 U/ml ROCK enzimet alkalmaztunk Tris pufferben (50 mM Tris-HCl, 0,1 mM EGTA; pH 7,5), 1 µM MC-LR, 5 mM MgCl₂ és 0,2 mM ATP jelenlétében. Negatív kontrollként enzim vagy szubsztrát nélküli mintákat alkalmaztunk. A mintákat 30°C-os vízfürdőben 0, 10, 30, 60, 90, illetve 120 percig inkubáltunk. A reakciókat háromszori TBS-el történő mosással, majd 1x SDS mintapufferrel 5 percen át történő főzéssel állítottuk le. Az immobilizáció, valamint a foszforiláció sikerességét Western blot módszerrel detektáltuk.

3.11. Flag-LIMK2v1 tiofoszforilációja és tisztítása

A tsA201 sejtekben overexpresszált és Flag affinitás gyantához immobilizált Flag-LIMK2v1-t 0,1 µg/ml PKC jelenlétében az *in vitro* fehérje foszforiláció részben leírtak szerint, 0,2 mM ATPγS alkalmazásával tiofoszforiláltuk. Háromszori TBS-el történő mosást követően mind a tiofoszforilált, mind a foszforilálatlan gyantához kötött fehérjét 300 µg/ml Flag-peptidet, 2 M MgCl₂-t, valamint proteázgátló mixet tartalmazó TBS oldattal eluáltuk (4°C-on egy éjszakán át tartó forgatás közben). Ezt követően az elúcióhoz használt puffert ZebaSpin sómentesítő oszlopon TBS-re cseréltük. Ehhez az oszlopról a tároló puffert centrifugálással (1000 g, 1 perc) eltávolítottuk, majd 50 µl TBS-el háromszor átmostuk. Ezután a gyantáról eluált fehérjeoldatot az oszlopra vittük és centrifugálással (1000 g, 2 perc) tiszta eppendorf csőbe gyűjtöttük. A fehérjeoldat koncentrációját 595 nm-en Bradford módszerrel (Bradford, 1976) mértük, a tisztaságát pedig SDS-PAGE gélelektroforézist követően Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük.

3.12. Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A protein foszfatáz aktivitás meghatározásához ^{32}P -al jelölt miozin könnyűláncot (^{32}P -MLC20) használtunk szubsztrátként (Erdődi és mtsai., 1995). A Flag-LIMK2v1 hatását a PP1 aktivitására natív PP1c alkalmazásával határoztuk meg (Erdődi és mtsai., 1992). A PP1c-t 0,1% BSA-t és 0,1% 2-merkaptóetanolt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferrel hígítottuk (5 nM végkoncentráció az esszében), majd 0-200 nM Flag-LIMK2v1-vel, illetve tiofoszforilált Flag-LIMK2v1-vel inkubáltuk 10 percig 30°C-on 20 μl térfogatban. A reakciót 10 μl szubsztrát hozzáadásával indítottuk, 10 percig inkubáltuk, majd 200 μl 10% TCA és 200 μl 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le.

A PMA-val kezelt THP-1 sejtek foszfatáz aktivitásának meghatározásához a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (800 g, 3 perc), PBS-el, majd TBS-EDTA pufferrel (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) mostuk, végül proteázgátló koktéllal, 50 mM merkaptóetanollal, 1mM PMSF-el és 3mM benzamidinnel frissen kiegészített TBS-EDTA puffert adtunk a sejtekhez. Folyékony nitrogénben történő fagyasztást és ultrahangos szonikálást követően a lizátumot centrifugáltuk (16 000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszóból 10 μl -eket tiszta eppendorf csövekbe mértünk, amit 10 μl TM pufferrel [20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% 2-merkaptóetanol] egészítettünk ki. 1 perc előinkubálást követően a defoszforilációt 15-30 másodpercig végeztük. A kihasított $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitását a kicsapódott fehérjék centrifugálással (10 000 g, 1 perc) történő elválasztása után szcintillációs számlálóban (Perkin Elmer) határoztuk meg 370 μl felülúszóból. A foszfatáz aktivitás változását százalékosan adtuk meg, a kontroll mintához viszonyítva (azt 100 %-nak véve).

3.13. Immunfluoreszcencia

A THP-1 sejteket 24 órával az immunfestést megelőzően Cell Carrier Ultra üveg aljú 96-lyukú lemezre (Perkin Elmer) raktuk ki, melynek felületét előzőleg I-es típusú kollagénnel kezeltük (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ kollagén 20 mM ecetsavban hígítva, 1 óra szobahőn). A festés során az egyes oldatok eltávolítása előtt a szuszpenziós sejteket a lemezen centrifugáltuk (1000 g, 1 perc). A médium eltávolítása után a sejteket PBS-el mostuk, majd 3,7 % paraformaldehid oldattal 15 percig szobahőn fixáltuk. PBS-el történő mosás után a sejteket 0,1 % Triton X-100-at tartalmazó PBS oldattal 10 percig szobahőn permeabilizáltuk. Újabb mosási lépéseket követően a blokkolást 1 % BSA/PBS oldattal egy órán át, szobahőn végeztük. Az anti-67LR elsődleges antitestet 0,1 % BSA/PBS

oldatban hígítottuk 1:100 arányban, melyben a sejteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A mintákat háromszor 10 percig PBS-el mostuk, majd 1:200 arányban 0,1 % BSA/PBS oldatban hígított Alexa 488-konjugált anti-nyúl-IgG-vel 90 percig szobahőn inkubáltuk, amit újabb háromszori PBS-el történő mosás követett. A sejtmagokat 2,5 µg/ml DAPI-val 2 percig festettük, végül háromszor 10 percig PBS-el mostuk. A konfokális képeket Opera Phenix High Content Screening készülékkel, 40x nagyítású vizes objektív lencsével (NA 1,1) készítettük. A felvételek a sejtmag fókuszsíkjában készültek.

3.14. Életképesség vizsgálata Alamar Blue tesztel

A THP-1 sejteket a kezelés előtti napon friss médiumban vettük fel, $2,5 \times 10^6$ /ml koncentrációban. A kezeléseket 96-lyukú lemezen végeztük 5×10^6 /ml sejtkoncentrációt alkalmazva. A DNR-t többféle szubletális koncentrációban alkalmaztuk (0-200 ng/ml) önmagában vagy 5 µM EGCG előkezeléssel (1 óra) kombinálva, majd 24 órán keresztül inkubáltunk. Ezután a médiumhoz Alamar Blue reagenst (O'Brien és mtsai., 2000) adtunk 20 µM végkoncentrációban, 2 órán át inkubáltunk, majd a fluoreszcenciát 560/590 nm-en mértük Tecan Spark Multimode Plate Reader (Thermo Fischer Scientific) készülékkel. A sejtek életképességét százalékban kifejezve adtuk meg a csak vivőanyaggal (dimetil-szulfoxid (DMSO)) kezelt kontroll sejtekhez viszonyítva (azt 100 %-nak véve).

3.15. Sejtek letapadásának vizsgálata szulforodamin B tesztel

A THP-1 sejtek makrofággá történő differenciációja során a sejtek letapadásának mértékét szulforodamin B (SRB) esszével vizsgáltuk (Vichai és Kirtikara, 2006). THP-1 monocitákat 100 nM PMA-val differenciáltattunk önmagában, 10 µM H1152 (30 perc) vagy 20 µM EGCG (1 óra) előkezeléssel kombinálva, majd 24, 48, ill. 72 óra múlva a médiumot a le nem tapadt sejtekkel együtt eltávolítottuk és PBS-el történő kétszeri mosást követően a sejtekhez jéghideg triklórecetsavat (TCA) adtunk 10 % (v/v) végkoncentrációban és 1 órán át 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően a kicsapódott fehérjeiket desztillált vízzel ötször mostuk, szárítottuk, majd 0,4 % (m/v) SRB-t tartalmazó 1 %-os ecetsav oldattal 10 percig szobahőn festettük. A nem kötődött festéket 1 %-os ecetsav oldattal történő ötszöri mosással távolítottuk el, majd a kötött festéket 10 mM Tris bázissal szolubilizáltuk. Az abszorbancia értékeket 515 nm hullámhosszon mértük Tecan Spark Multimode Plate Reader segítségével (Thermo Fischer Scientific). A letapadás mértékét százalékban fejeztük ki, a 72 órán át PMA-val differenciáltatott sejtek letapadásának mértékét véve 100 %-nak.

3.16. Elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés (ECIS)

Az elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés (ECIS) készülékkel (Applied Biophysics) a differenciálódó sejtek letapadásának erősségét vizsgáltuk (Smith és mtsai., 2018). A sejteket 24-lyukú lemezen 10 μ M H1152-vel (30 perc) vagy 20 μ M EGCG-vel (1 óra) előkezeltük, majd 100 nM PMA hozzáadásával differenciációt indukáltunk. Ezt követően a sejteket azonnal 8W10E ECIS 8 elektródás tenyésztőedénybe pipettáztuk, majd a letapadást a rezisztencia valós idejű, percenkénti mérésével követtük nyomon 72 órán keresztül, 4000 Hz frekvenciájú elektromos impulzust alkalmazva. Az ábrázolt normalizált rezisztencia az egyes időpontokban a kezelésenkénti 0. percben mért átlagos rezisztenciaértékekre vonatkoztatott értéket jelöli, amely arányos a sejtek letapadásának erősségével.

3.17. Statisztikai analízisek

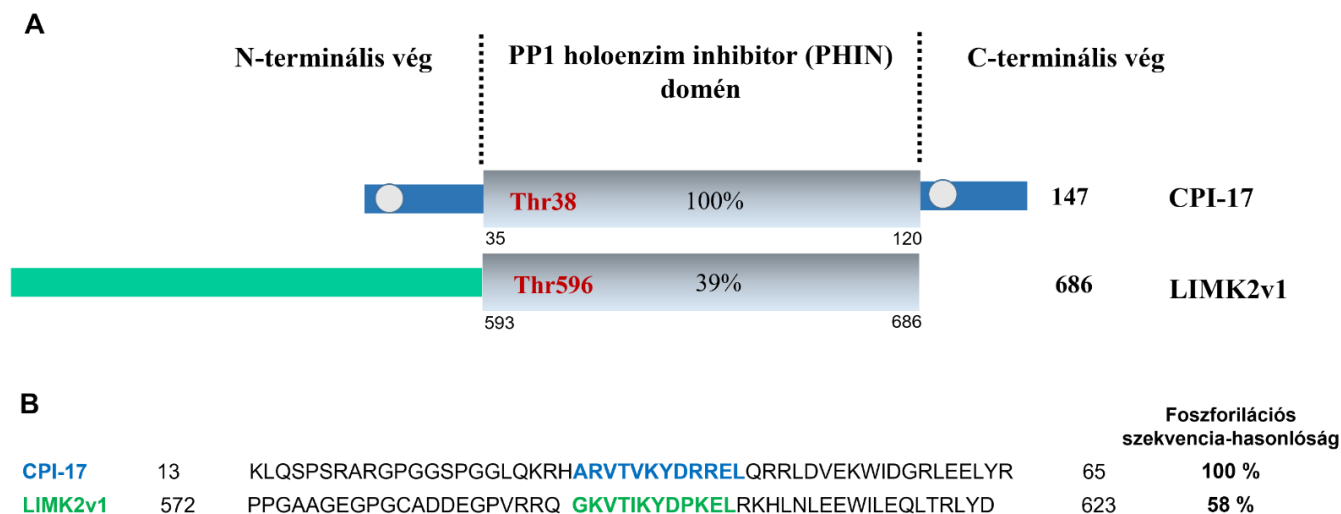
A foszfatázaktivitás mérések, valamint a Szulforodamin B teszt adatainak statisztikai analíziséhez Student-féle t-tesztet, majd poszthoc analízisként Šidak-tesztet végeztünk. Az ECIS mérések, Alamar Blue életképességi vizsgálatok, illetve a Western blot képek denzitometrálnálási adatait kétutas ANOVA módszerrel elemeztük (Tukey- vagy Dunnett-féle poszt hoc analízissel kiegészítve). A statisztikai analízist és a diagramok készítését a GraphPad Prism 8.0.1. szoftverrel végeztük és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. A diagramok esetén az egyes oszlopok legalább három független mérés átlagát, míg a hibasávok az adatok szórását mutatják.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A LIMK2v1 foszfatázgátló szerepének vizsgálata

4.1.1. A Flag-LIMK2v1-t foszforiláló kinázok azonosítása

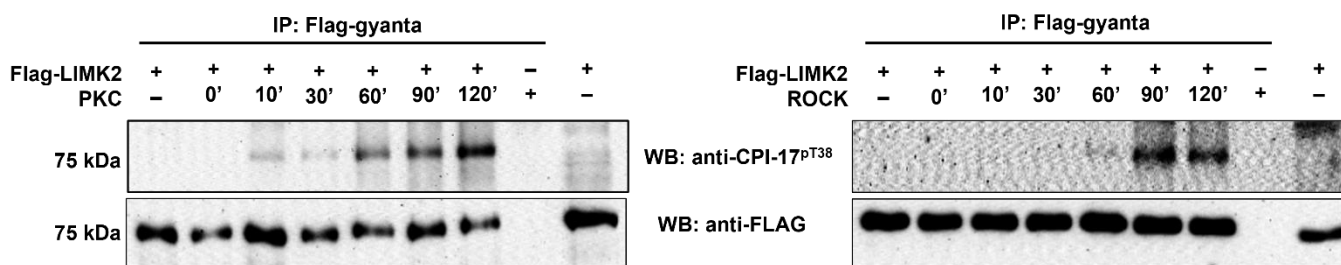
Ismert, hogy a MP specifikus gátló fehérjéje, a CPI-17, illetve egyes rokon fehérjéinek expressziója számos humán tumoros sejtvonalban emelkedést mutat (Jin és mtsai., 2006). A foszforilált CPI-17 a tumorszupresszor merlin gátlása, valamint a sejtburjánzást elősegítő ERM fehérjecsalád aktiválása révén képes a Ras jelátviteli útvonal túlzott működésének kiváltására, elősegítve ezzel a daganatos transzformáció indukálását (Riecken és mtsai., 2016). A LIMK2 75 kDa méretű 1-es izoformájának (LIMK2v1) C-terminális része tartalmaz egy PHIN-szerű domént (Dubois és mtsai., 2003. Vallée, 2018), továbbá egy treonin oldalláncot (Thr596), amelynek aminosav környezete közel 60%-os azonosságot mutat a CPI-17 inhibitor foszforilációs helyével (9. ábra). A továbbiakban a LIMK2v1 CPI-17-szerű szakaszon történő foszforilációjának és foszfatázgátló tulajdonságának jellemzésére fókuszáltunk.



9. ábra A CPI-17 és LIMK2v1 fehérjék foszforilációs szekvenciájának összehasonlítása

(A) A szürke boksx jelöli a PP1 holoenzim inhibitor domén (PHIN) elhelyezkedését, benne a doménszekvenciák hasonlósága százalékban kifejezve. Az aktiváló foszforilációs helyek pirossal, míg az egyéb CPI-17 foszforilációs helyek szürke körökkel jelölve. (B) A CPI-17 és a LIMK2v1 foszforilációs szekvenciája (késsel, illetve zölddel kiemelve) és annak aminosav környezete, valamint a foszforilációs szekvenciák hasonlóságának mértéke százalékban kifejezve.

Mivel a CPI-17 és rokon fehérjéi elsősorban PKC és ROCK enzimek által foszforilálódnak és aktiválódnak, *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a rekombináns LIMK2v1 CPI-17-szerű helyen történő foszforilációját PKC, illetve ROCK enzimek jelenlétében. A Flag-LIMK2v1-t kódoló plazmidot az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint tsA201 sejtekbe jutattuk be és 48 órával a transzfekció után a sejteket lizáltuk. Az overexpresszált Flag-LIMK2v1-t az immunprecipitáció fejezetben leírtak szerint Flag affinitás gyantához kötöttük, majd az így immobilizált fehérjét PKC, illetve ROCK enzimek és ATP jelenlétében inkubáltuk 10, 30, 60, 90, illetve 120 percen keresztül. A foszforiláció mértékét anti-CPI-17^{pThr38} antitest segítségével detektáltuk. A 10. ábrán látható, hogy a PKC már 10 perc, míg a ROCK 60 perc elteltével képes volt foszforilálni a gyantához kötött Flag-LIMK2v1-t, 90, illetve 120 perc inkubációt követően pedig már mindkét enzim jelentős mértékben növelte a fehérje foszforilációját a CPI-17-szerű helyen. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy *in vitro* körülmények között mind a PKC, mind a ROCK képes a Flag-LIMK2v1 CPI-17-szerű helyének foszforilációjára.

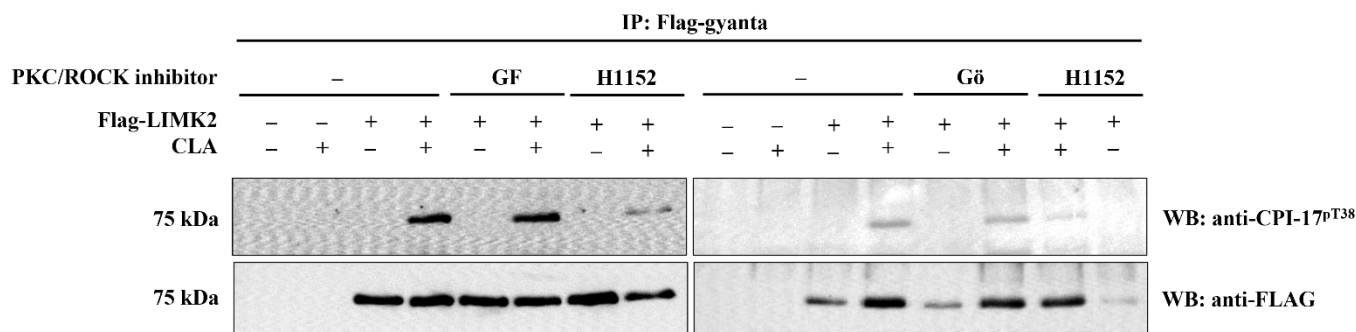


10. ábra Flag-LIMK2v1 *in vitro* foszforilációja PKC és ROCK által

A Flag-LIMK2v1-t tsA201 sejtekben overexpresszáltuk és Flag affinitás gyantán immobilizáltuk, majd PKC vagy ROCK enzimekkel foszforiláltuk 10, 30, 60, 90 vagy 120 percen keresztül. Az immobilizáció sikerességét anti-Flag, a CPI-17-szerű helyen bekövetkező foszforiláció mértékét anti-CPI-17^{pThr38} antitestekkel, Western blot módszerrel detektáltuk.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a LIMK2v1 CPI-17-szerű helyének foszforilációja megvalósul-e élő sejtekben is, endogén PKC és ROCK enzimek által. Ehhez megkísérletük a tsA201 sejtekben overexpresszált Flag-LIMK2v1 foszforilációját PKC aktiválás révén kiváltani, azonban PMA-val történő PKC aktiválást követően a LIMK2v1 CPI-17-szerű helyen történő foszforilációját nem tudtuk detektálni (nem bemutatott adatok). Ezért a Flag-LIMK2v1 foszforilációját foszfatáz gátlással próbáltuk indukálni, a PKC és ROCK szerepét pedig kináz gátlószerek alkalmazásával kívántuk vizsgálni. Flag-LIMK2v1-et expresszáló tsA201 sejteket PKC inhibitor GF109203x-el (5 μ M), Gö6983-al (200 nM) vagy ROCK inhibitor H1152-vel (10 μ M) 30 percen át előkezeltünk, majd 50 nM foszfatázgátló CLA jelenlétében vagy hiányában további 30 percig inkubáltunk. Ezt

követően a sejtlizátumokat Flag gyantához kötöttük és az immobilizált Flag-LIMK2v1-t SDS mintapufferrel történő főzéssel eluáltuk a gyantáról, végül a mintákat Western blot módszerrel analizáltuk. A Flag-LIMK2v1 overexpressziójának és a kötés sikerességének ellenőrzésére anti-Flag, a CPI-17-szerű helyen történő foszforiláció detektálására pedig anti-CPI-17^{pThr38} antitestet használtunk. A 11. ábra alapján elmondhatjuk, hogy a rekombináns Flag-LIMK2v1 CLA jelenlétében a CPI-17-szerű helyen nagymértékben foszforilált, és ez a foszforiláció ROCK gátlószerrel kombinációban alkalmazva a CLA-t jelentős mértékben csökken, míg a PKC gátlószerrel jelenlétében a CLA-indukált foszforiláció nem változik számottevően. Ebből arra következtettünk, hogy a ROCK enzim nem csak *in vitro* körülmények között, de a sejtekben is képes a LIMK2v1 CPI-17-szerű helyen történő foszforilációjának szabályozására. Ezzel szemben a kétféle PKC gátlószerrel kapott eredményeink arra utalnak, hogy bár *in vitro* körülmények között a PKC hatékonyan képes a LIMK2v1 foszforilációját katalizálni a CPI-17-szerű helyen, élő sejtekben ez a folyamat nem, vagy csak kis mértékben valósul meg. Ez magyarázatot adhat arra, hogy PMA-val történő PKC aktiválás során miért nem sikerült a LIMK2v1 foszforilációját indukálni tsA201 sejtekben.



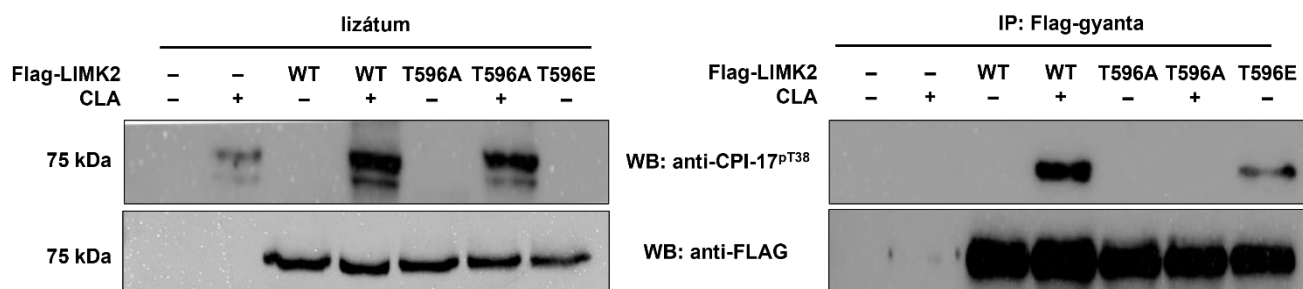
11. ábra PKC és ROCK inhibitorok hatása Flag-LIMK2v1 foszforilációjára a CPI-17-szerű helyen

A Flag-LIMK2v1-t tsA201 sejtekben overexpresszáltuk, majd 48 óra elteltével a sejteket 30 perc GF109203x, Gö6983 vagy H1152 inhibitorral történő előkezelésnek vetettük alá, végül 50 nM CLA jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk további 30 percen át. Az overexpresszált fehérjét Flag affinitás gyantán immobilizáltunk. Az immobilizáció sikerességét anti-Flag, a CPI-17-szerű helyen bekövetkező foszforiláció mértékét anti-CPI-17^{pThr38} antitestekkel, Western blot módszerrel detektáltuk.

4.1.2. A Flag-LIMK2v1 foszforilálódó oldalláncának azonosítása

Annak bizonyítására, hogy a Flag-LIMK2v1 foszforilációjának CLA jelenlétében megfigyelhető nagyfokú emelkedése valóban a CPI-17 Thr38 oldalláncának megfelelő helyen történik, a Flag-LIMK2v1-t kódoló vektort helyspecifikus mutagenézisnek vetettük alá. Az

Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint létrehoztuk a Flag-LIMK2v1 Thr596 oldalláncának nem foszforilálható (Flag-LIMK2v1^{T596A}), valamint foszforilációt mimikáló (Flag-LIMK2v1^{T596E}) variánsait, majd azokat tsA201 sejtekbe juttattuk be. 48 óra poszttranszfekciós időt követően a sejteket 50 nM CLA-val kezeltük 30 percen át, lizáltuk, majd Flag affinitás gyantával inkubáltuk. Az ily módon immobilizált Flag-LIMK2v1-t SDS mintapufferrel történő főzéssel eluáltuk a gyantáról, végül a kérdéses helyen történő foszforilációt Western blot segítségével ellenőriztük anti-CPI-17^{pThr38} antitest segítségével. A 12. ábrán CLA jelenlétében a sejtízátumokban megfigyelhető egy 75 kDa méretű fehérje foszforilációja a CPI-17-szerű helyen, amely foszforiláció Flag-LIMK2v1 overexpresszió hatására tovább emelkedik. Az endogén LIMK2v1-től gyantán elválasztott vad típusú Flag-LIMK2v1 jelentős mértékű foszforilációja látható a CPI-17-szerű helyen a korábban bemutatott kísérlettel megegyezően, ezzel szemben a Flag-LIMK2v1^{T596A} mutáns esetén a kérdéses foszforiláció elmaradt. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a CLA jelenlétében megfigyelhető jelentős mértékű foszforiláció emelkedés valóban a CPI-17-szerű helyen, a Thr596 oldalláncon következik be. Megjegyzendő, hogy kismértékben a T596E mutációt hordozó Flag-LIMK2v1 is keresztreakciót mutatott az anti-CPI-17^{pThr38} antitesttel.



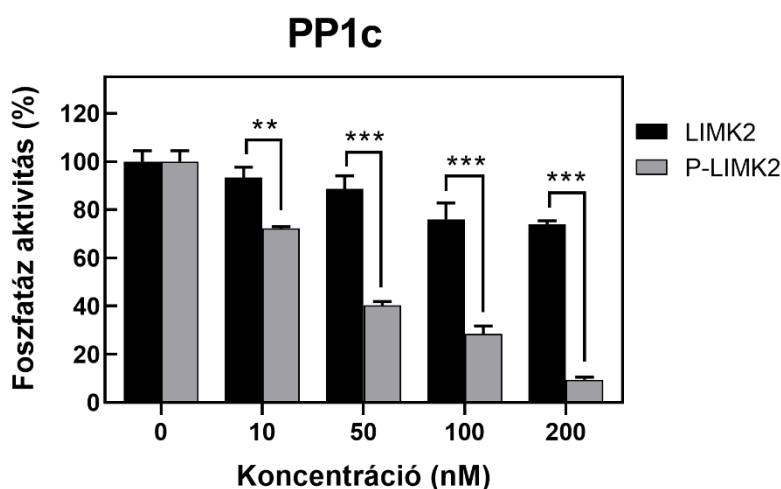
12. ábra Flag-LIMK2v1 mutánsok foszforilációjának vizsgálata CLA jelenlétében

Vad típusú, T596A, illetve T596E mutációt hordozó Flag-LIMK2v1-t tsA201 sejtekben overexpresszáltunk, majd 48 óra elteltével a sejteket 30 percen át 50 nM CLA-val történő kezelésnek vetettük alá, végül az overexpresszált fehérjéket Flag affinitás gyantán immobilizáltuk. Az immobilizáció sikerességét anti-Flag, a CPI-17-szerű helyen bekövetkező foszforiláció mértékét anti-CPI-17^{pThr38} antitestekkel, Western blot módszerrel detektáltuk.

4.1.3. Flag-LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata

A CPI-17 fehérjecsalád tagjairól ismert, hogy PP1 gátló hatásuk foszforilációjukat követően sokszorosára emelkedik, ezért vizsgálni kívántuk a foszforilálatlan és foszforilált Flag-LIMK2v1 hatását a PP1c foszfatáz aktivitására. Ehhez a Flag affinitás gyantán immobilizált Flag-LIMK2v1 fehérjét PKC és ATP γ S jelenlétében tiofoszforiláltuk (a foszfatáz esszé során a defoszforiláció elkerülése érdekében), majd Flag-peptid segítségével eluáltuk a gyantáról. Ezt követően a tisztított

fehérje foszforilálatlan és tiofoszforilált formáinak jelenlétében, különböző koncentrációkat alkalmazva (0, 10, 50, 100, 200 nM) megmértük a PP1c katalitikus alegység foszfatáz aktivitását. A méréshez ^{32}P -al jelölt miozin könnyűláncot (^{32}P -MLC20) használtunk szubsztrátként. A 13. ábrán látható, hogy a foszforilálatlan Flag-LIMK2v1 100-200 nM koncentrációtartományban 10-30%-kal csökkentette a PP1c foszfatáz aktivitását, míg a tiofoszforilált LIMK2v1 már 10 nM koncentrációban képes volt hasonló mértékű gátlás kifejtésére, 200 nM koncentrációban alkalmazva pedig mintegy 10%-ra csökkentette az enzim aktivitását. Ebből arra következtethetünk, hogy a LIMK2v1 a CPI-17 család tagjaihoz hasonlóan foszforilált állapotban a PP1 típusú foszfatázok hatékony gátló fehérjéje lehet.



13. ábra Flag-LIMK2v1 hatása a PP1 katalitikus alegység foszfatáz aktivitására

0-200 nM Flag-LIMK2v1-t vagy tiofoszforilált Flag-LIMK2v1-t inkubáltunk natív PP1c-vel, és a foszfatáz aktivitást ^{32}P -MLC20 szubsztrát alkalmazásával határoztuk meg az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A Flag-LIMK2v1-t nem tartalmazó minták foszfatáz aktivitását vettük 100 %-nak. Statisztikai analízisként t-próbát alkalmaztunk Sidak-féle poszt-hoc teszttel. (n = 3, ** p < 0,01; *** < 0,001.)

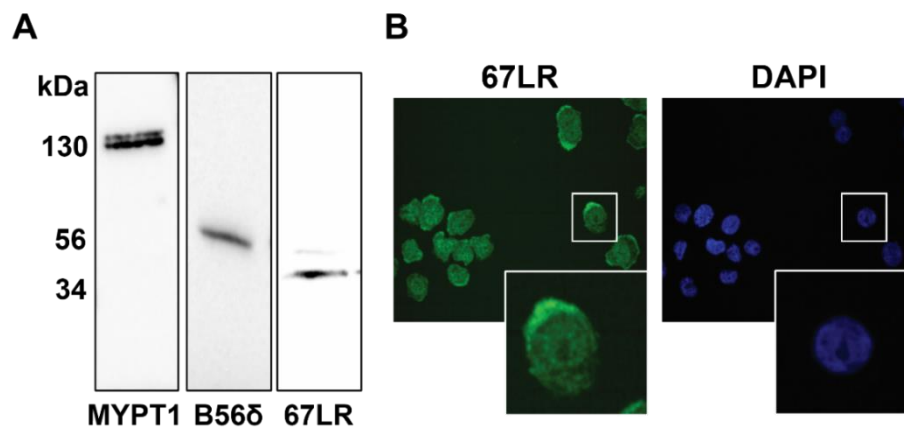
4.2. A miozin foszfatáz szerepe THP-1 leukémiás sejtek kemoszenzitivitásában

4.2.1. Az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonal komponenseinek jelenléte és lokalizációja THP-1 sejtekben

Az EGCG-ről ismert, hogy a daganatos sejtek proliferációjának gátlására, illetve azokban apoptózis indukálására képes (Umeda és mtsai., 2008), ezirányú hatásának molekuláris mechanizmusa azonban még nem minden részletében feltárt. THP-1 sejtekben korábban már kimutattuk, hogy a DNR-indukált sejthalál a foszfatázok aktiválásával jár együtt, míg a foszfatázok

gátlása csökkentette a sejtek DNR-el szembeni érzékenységét, amely a MYPT1 Thr696 és a pRb Thr826 oldalláncának emelkedett foszforilációjával járt együtt (Dedinszki és mtsai., 2015; Kiss és mtsai., 2008). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a MP aktiválása révén lehetőség nyílt a leukémiás sejtek kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenységének fokozására. A MP közvetlen aktiválására alkalmas agonista nem áll rendelkezésre, azonban ismert, hogy az EGCG kötődése a 67 kDa laminin receptorhoz (67LR) cAMP képződéshez és a PKA enzim aktiválásához vezet, amelyet a PP2A aktivitásának növekedése követ, ezen események sorozata pedig a MYPT1 Thr696 gátló foszforilációs helyének defoszforilációját, ezáltal a MP holoenzim aktiválását eredményezi (Tsukamoto és mtsai., 2014; Bátori és mtsai., 2017; Umeda és mtsai., 2008). Mindezek alapján vizsgálni kívántuk az EGCG kemoszenzitizáló hatását DNR-el kezelt THP-1 sejtek életképességére.

Első lépésként ellenőriztük az EGCG/67LR/PP2A útvonal komponenseinek jelenlétét és a receptor lokalizációját THP-1 sejtekben. Teljes lizátumban Western blot módszerrel vizsgáltuk a MYPT1 regulátor alegység, a 67LR, illetve a PP2A B56δ alegységének expresszióját, amelyről korábban kimutatták, hogy PKA általi foszforiláció révén szabályozódik (Ahn és mtsai., 2007). Azt találtuk, hogy a THP-1 sejtekben ezen fehérjék mindegyike jelen van (14. A ábra), a PKA pedig általánosan előforduló enzimnek tekinthető az emlős sejtekben (Skalhegg és Tasken, 2000).



14. ábra Az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonal komponenseinek expressziója és a 67LR lokalizációja THP-1 sejtekben

(A) A MYPT1, PP2A-B56δ alegység és a 67 kDa laminin receptor (67LR) expresszióját THP-1 sejtek teljes lizátumában Western blot módszerrel vizsgáltuk. (B) A 67LR lokalizációját immunfluoreszcens festéssel, konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá.

Az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonal aktivációjához elengedhetetlen a 67LR membránlokalizációja, ezért immunfestés segítségével megvizsgáltuk a receptor lokalizációját THP-1 sejtekben. A szuszpenziós sejteket előzőleg kollagénnel bevont, üveg aljú 96-lyukú

tenyésztőedénybe raktuk, majd a sejtek fixálását és permeabilizálását követően 67LR-re specifikus antitesttel jelöltük. Az immunreakció detektálására fluoreszcens festékkel jelzett másodlagos antitestet használtunk. A 67LR lokalizációját az 14. B ábra mutatja. A receptor mind a sejtmagban, mind a citoplazmában megtalálható, de elsősorban a sejtmembránban koncentrálódik. Mindezek alapján a leukémia eredetű THP-1 sejtek kezelése EGCG-vel kiválthatja a MP aktiválását az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonalon keresztül.

4.2.2. Az EGCG hatása THP-1 sejtek kemoszenzitivitására

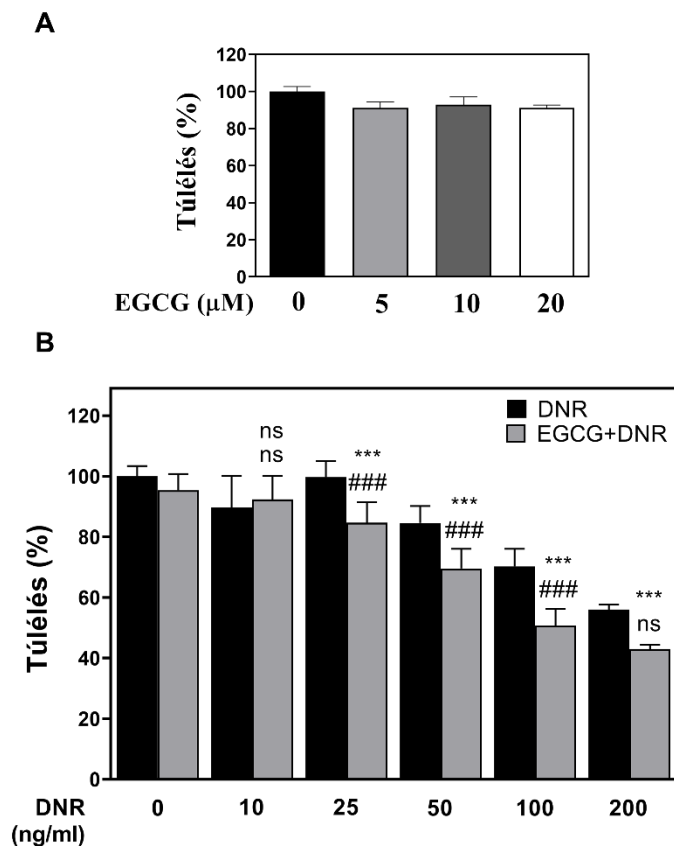
THP-1 leukémiás sejtek életképességének vizsgálata

Annak vizsgálatára, hogy az EGCG befolyásolja-e a THP-1 leukémiás sejtek DNR-el szembeni érzékenységét, a sejteket elsőként EGCG-vel kezeltük önmagában, 5-20 μ M koncentrációtartományban, majd a sejtek életképességét Alamar Blue teszttel mértük. Eredményeink alapján az EGCG kezelés önmagában a legnagyobb alkalmazott koncentrációban is mindössze kismértékű citotoxicitást okozott (8%) (15. A ábra), ezért a kombinált kezelésekhez a továbbiakban az általunk vizsgált legkisebb, 5 μ M koncentrációt alkalmaztuk. A DNR kezelés során szubletális koncentrációk alkalmazása volt a célunk, amelyek kis vagy közepes mértékű sejthalált okoznak. A 15. B ábrán látható, hogy 10-200 ng/ml koncentrációtartományban alkalmazva a DNR önmagában 5-44% mértékű életképesség csökkenést okozott, míg 5 μ M EGCG előkezeléssel kombinálva a DNR-indukálta citotoxicitás 25, 50, ill. 100 ng/ml koncentrációknál szignifikánsan megnövekedett. Az eredmények arra utalnak, hogy az EGCG fokozta a THP-1 sejtek DNR kezeléssel szembeni érzékenységét.

THP-1 leukémiás sejtek proliferációjának vizsgálata

Annak vizsgálatára, hogy az előzőekben megfigyelt életképesség csökkenés összefüggésbe hozható-e a sejtek proliferációs képességének csökkenésével, Western blot módszerrel analizáltuk a sejtproliferációs markerként használt proliferáló sejtmagi antigén (PCNA) nevű fehérje expresszióját a fenti kezeléseknél alávetett THP-1 sejtekben. Azt találtuk, hogy 24 óra EGCG kezelés önmagában csak kismértékben, míg 50 ng/ml DNR már szignifikánsan csökkentette (mintegy 25 %-kal) a PCNA fehérje expresszióját. A legjelentősebb hatást viszont a kombinált kezelés esetén figyeltük meg, amely 24 óra alatt mintegy 50%-al csökkentette a PCNA expressziós

szintjét a kontroll sejtekhez képest (16. ábra). Ez arra utal, hogy a kombinált kezelés erőteljesebb proliferáció gátló hatással bír, mint a két szer külön-külön alkalmazva.



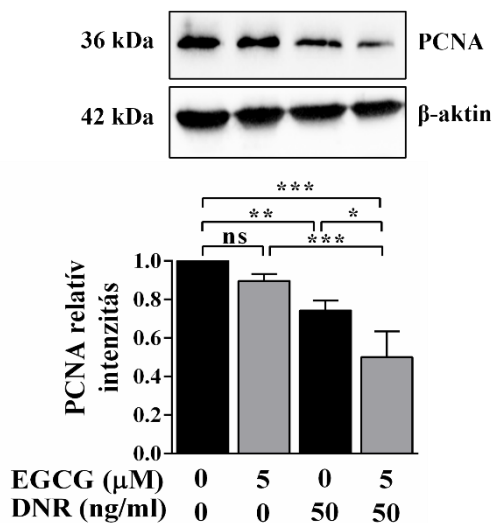
15. ábra EGCG kezelés hatása THP-1 sejtek életképességére daunorubicin jelenlétében

(A) A THP-1 sejteket 1 órán át kezeltük 5, 10 illetve 20 μM EGCG-vel, majd az életképességet Alamar Blue tesztel vizsgáltuk. (B) A sejteket 5 μM EGCG-vel 1 órán át előkezeltük, majd további 24 órán át inkubáltuk különböző szubletális daunorubicin (DNR) koncentrációk (10, 25, 50, 100, 200 ng/ml) mellett. A kezeletlen sejtek életképességét tekintettük 100%-nak. Az adatok 5 független mérés átlagát és a hozzá tartozó szórást mutatják. Statisztikai analízisként kétutas ANOVA-t használtunk. Szignifikáns változások * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (* EGCG kezeléshez viszonyítva; # DNR kezeléshez viszonyítva, ns: nem szignifikáns.)

EGCG kezelés hatásának vizsgálata THP-1 sejtek DNR által indukált apoptózisában

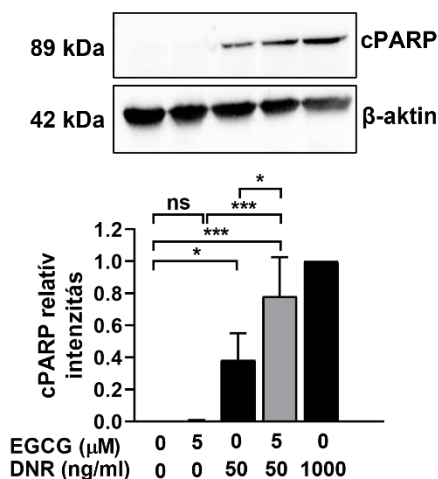
Ismert, hogy a DNR kezelés THP-1 sejtekben apoptózist indukál (Kiss és mtsai., 2008). Annak vizsgálatára, hogy a kombinált kezelés hatására megfigyelt életképesség csökkenést fokozott apoptózis okozza-e, a sejteket 50 ng/ml DNR-el kezeltük 48 órán keresztül 5 μM EGCG előkezeléssel kombinálva vagy anélkül és Western blot módszerrel vizsgáltuk a hasadt PARP megjelenését, mint az apoptotikus sejthalál egyik jellegzetes biokémiai markerét. Az apoptózis folyamán a kaszpáz-3 és/vagy kaszpáz-7 a PARP-ot egy 89 kDa és egy 24 kDa méretű fragmentre

hasítja (Tewari és mtsai., 1995), az általunk alkalmazott antitest pedig a 89 kDa fragment felismerésére képes (17. ábra).



16. ábra EGCG és DNR kezelés hatása a PCNA expressziójára THP-1 sejteken

THP-1 sejteket 5 μ M EGCG előkezelésnek vetettünk alá, majd további 24 órán át 50 ng/ml DNR-el kezeltük önmagában vagy EGCG-vel kombinációban alkalmazva és Western blot módszerrel vizsgáltuk a kezelések hatását a sejtproliferációs markerként ismert PCNA fehérje expressziójára. A gélre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására β -aktin kontrollt használtunk. A hisztogram a β -aktinra normalizált fehérjeexpresszió mértékét mutatja a sávok denzitometriai analízise alapján, három független mérés átlagára vonatkoztatva. Szignifikáns változások *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: nem szignifikáns.



17. ábra EGCG és DNR kezelés hatása a PARP fehérje hasadására THP-1 sejtekben

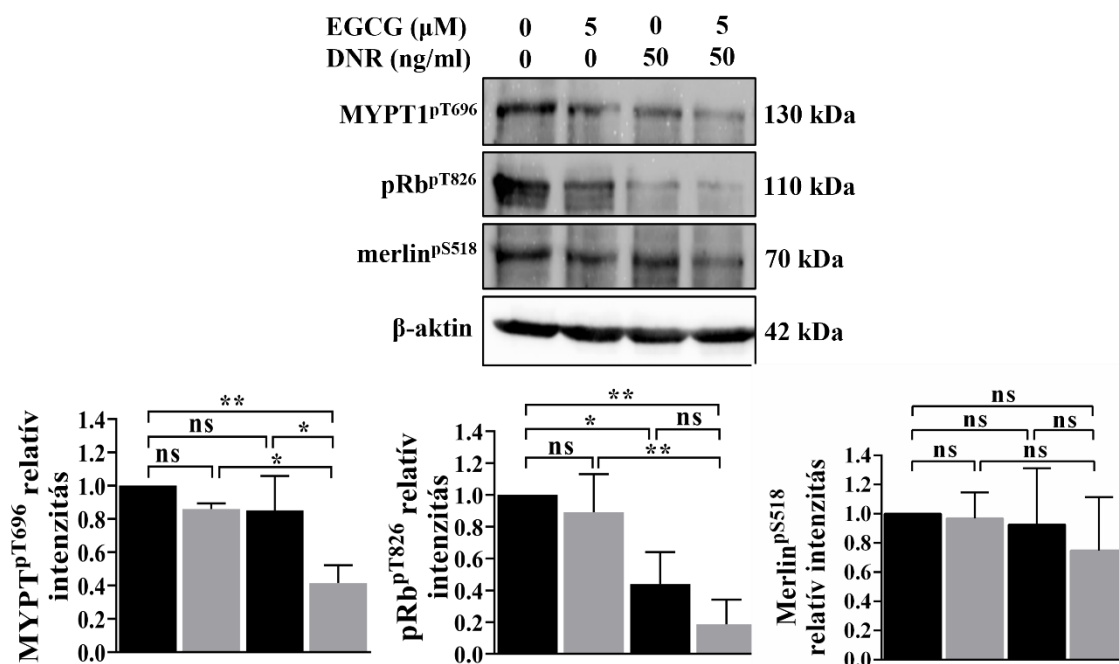
THP-1 sejteket 5 μ M EGCG előkezelésnek vetettünk alá, majd további 48 órán át 50 ng/ml DNR-el kezeltük önmagában vagy EGCG-vel kombinációban alkalmazva és Western blot módszerrel vizsgáltuk a PARP fehérje hasadásának mértékét. Pozitív kontrollként 24 órán át 1000 ng/ml DNR-el kezelt THP-1 sejtek lizátumát használtuk. A gélre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására β -aktin kontrollt alkalmaztunk. A hisztogram a β -aktinra normalizált, majd a pozitív kontrollhoz viszonyított fehérjeexpresszió mértékét mutatja a sávok denzitometriai analízise alapján, három független mérés átlagára vonatkoztatva. Szignifikáns változások *p < 0,05; ***p < 0,001; ns: nem szignifikáns.

Pozitív kontrollként 1000 ng/ml DNR kezelt THP-1 sejtizátumot használtunk. A 89 kDa molekulatömegű hasadt PARP fehérje nem volt detektálható a kontroll, illetve az EGCG kezelt sejtekben 48 óra után sem, míg 1000 ng/ml DNR kezelés hatására már 24 óra kezelést követően is szignifikánsan megemelkedett a mennyisége. 50 ng/ml DNR kezelés hatására kismértékű PARP hasadást detektáltunk, míg a kombinált kezelést követően szignifikánsan emelkedett mértékű PARP hasadás volt megfigyelhető. A pozitív kontrollhoz viszonyított denzitometrálnálási adatok azt mutatják, hogy a hasadt PARP mennyisége a kombinált kezelést kapott mintákban a csak DNR-kezelt sejtekhez képest körülbelül kétszeresére emelkedett. Az eredmények arra utalnak, hogy az EGCG szignifikánsan növeli a DNR által indukált apoptózis mértékét THP-1 sejtekben.

4.2.3. EGCG hatása a MYPT1 regulátor alegység és a MP szubsztrátjainak foszforilációjára és aktivitására

Annak vizsgálatára, hogy az EGCG hogyan befolyásolja a MP regulátor alegységének, illetve szubsztrátjainak foszforilációját, a THP-1 leukémiás sejteket 50 ng/ml DNR-el kezeltük 3 órán keresztül önmagában, vagy 5 μ M EGCG előkezeléssel kombinálva és Western blot módszerrel vizsgáltuk a MYPT1, a pRb és a merlin foszforiláltságát. Az EGCG önmagában kismértékben csökkentette a MYPT1 Thr696 oldalláncának, csakúgy, mint a pRb Thr826 oldalláncának foszforilációját. A DNR önmagában szintén kismértékű foszforiláció csökkenést okozott a MYPT1 Thr696 oldalláncon, míg a pRb Thr826 oldalláncának defoszforilációja szignifikáns változást mutatott. Azonban a kombinált kezelés hatására sokkal markánsabb defoszforilációt figyelhattunk meg, mind a MYPT1 Thr696, mind a pRb Thr826 oldalláncok vonatkozásában. Önmagában sem az EGCG, sem a DNR nem befolyásolta jelentősen a merlin Ser518 foszforilációs szintjét, azonban a kontroll sejtekhez viszonyítva jelentős csökkenés következett be a két szer együttes jelenlétében, bár ez a hatás nem bizonyult szignifikánsnak (18. ábra).

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az EGCG a MP aktivitásának fokozása révén a pRb és merlin fehérjék defoszforilációját okozza, és ezen keresztül felerősítheti azok tumorszuppresszor funkcióit. Ezek a folyamatok megmagyarázhatják, hogyan képes az EGCG a THP-1 sejtek DNR-el szembeni érzékenyítésére.



18. ábra EGCG és DNR kezelés hatása a miozin foszfatáz regulátor alegységének és tumorszupresszor szubsztrátjainak foszforilációjára

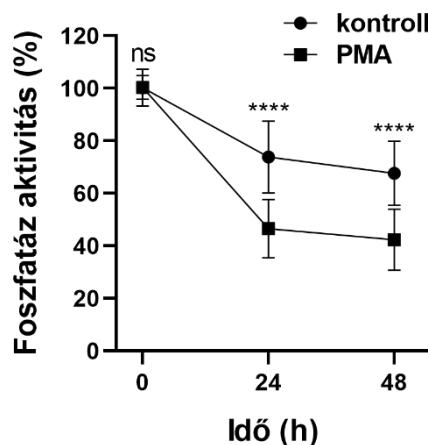
A THP-1 sejteket 5 μM EGCG-vel 1 órán át előkezeltük, majd 50 ng/ml DNR jelenlétében vagy hiányában további 3 órán át inkubáltuk és Western blot módszerrel vizsgáltuk a MYPT1 Thr696, a pRb Thr826 és a merlin Ser518 oldalláncának foszforilációját. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására β-aktin kontrollt használtunk. Statisztikai analízisként kétutas ANOVA-t alkalmaztunk. A hisztogram a β-aktinra normalizált fehérjeexpresszió mértékét mutatja a sávok denzitometriai analízise alapján, három független mérés átlagára vonatkoztatva. Szignifikáns változások *p < 0,05; **p < 0,01; ns: nem szignifikáns.

4.3. A miozin foszfatáz szerepe THP-1 sejtek makrofág differenciációja során

4.3.1. THP-1 sejtek foszfatáz aktivitásának változása makrofág-differenciáció során

A PP1 és PP2A enzimek számos fehérje defoszforilációja révén fontos szerepet játszanak a sejtek jelátviteli útvonalainak szabályozásában (Virshup és mtsai., 2009; Fardilha és mtsai., 2010; Baskaran és mtsai., 2018), a makrofág differenciáció folyamatában betöltött szerepükről viszont meglehetősen kevés információval rendelkezünk, annak ellenére, hogy a PP1 ezirányú lehetséges szerepére vonatkozó adatok már hosszú ideje rendelkezésre állnak (Omay és mtsai., 1995). A PP1 és PP2A enzimek makrofág differenciáció során történő aktivitásváltozásának vizsgálata céljából *in vitro* foszfatázaktivitás méréseket végeztünk, melynek során kezeletlen, illetve PMA-val stimulált THP-1 sejtek lizátumának foszfatáz aktivitását mértük foszforilált MLC20 szubsztrát alkalmazásával. Azt tapasztaltuk, hogy a fehérjemennyiségre normalizált foszfatázaktivitás a

kezeletlen THP-1 sejtekben az idő előrehaladtával csökkent, 48 óra elteltével a kiindulási érték mintegy 68%-ára. Ezzel szemben, ha a sejteket PMA-val kezeltük, a foszfatázaktivitás csökkenése még kifejezettebb volt, ami 46, illetve 42 % maradék aktivitást eredményezett 24 illetve 48 óra differenciációt követően (19. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja a PP1 és/vagy PP2A enzimek gátlásával járhat együtt.



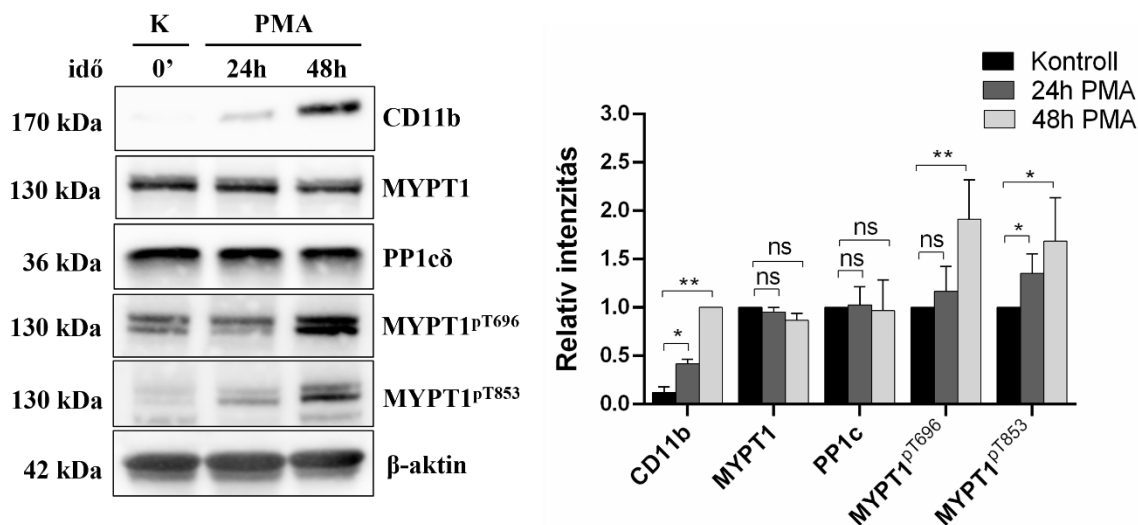
19. ábra A PP1 és PP2A enzimek foszfatáz aktivitásának változása THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

A THP-1 sejteket 100 nM PMA jelenlétében vagy hiányában 24 illetve 48 órán át inkubáltuk, majd a sejtlyázátumok foszfatáz aktivitását a jelölt időpontokban az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint mértük. A kezeletlen sejtek kiindulási foszfatázaktivitását vettük 100%-nak. Statisztikai analízisként t-próbát alkalmaztunk, Sidak-féle poszt-hoc teszttel. (n = 4, **** p < 0,0001; ns: nem szignifikáns.)

4.3.2. A miozin foszfatáz expressziójának és foszforilációjának változása THP-1 sejtek PMA- illetve VD₃-indukált differenciációja során

Az irodalomból ismert, hogy a PMA-indukált makrofág differenciáció a ROCK jelátviteli útvonalon keresztül zajlik (Yang és mtsai., 2017; Bhattacharya és mtsai., 2020), azonban a MP enzim lehetséges szerepe a folyamatban jelenleg még nem tisztázott. Ezért Western blot módszerrel megvizsgáltuk a MP aktivitását a makrofág differenciáció folyamatában, elemezve a katalitikus és regulátor alegységek expresszióját, illetve a regulátor alegység foszforilációjának mértékét (20. ábra). A differenciáció hatékonyságának ellenőrzése céljából vizsgáltuk a makrofág differenciáció markereként gyakran használt CD11b sejtfelszíni receptor expresszióját is és azt találtuk, hogy az említett marker expressziója 24, illetve 48 óra PMA-indukciót követően 2-szeresére, illetve 4-szeresére emelkedett. A PMA kezelés nem befolyásolta számottevően sem a PP1cδ katalitikus, sem a MYPT1 regulátor alegység expresszióját, azonban szignifikáns növekedést tapasztaltunk a szabályozó alegység Thr696 és Thr853 oldalláncainak foszforilációját tekintve. Ezen oldallancok

emelkedett foszforilációja a MP gátlásához vezet, ami arra utal, hogy a PMA-indukált makrofág differenciáció csökkent MP aktivitással jár együtt. Ezen eredményekkel összhangban a MP szubsztrátjának, a 20 kDa MLC20 fokozott foszforilációját is megfigyeltük PMA kezelés hatására (lásd 22. ábra).

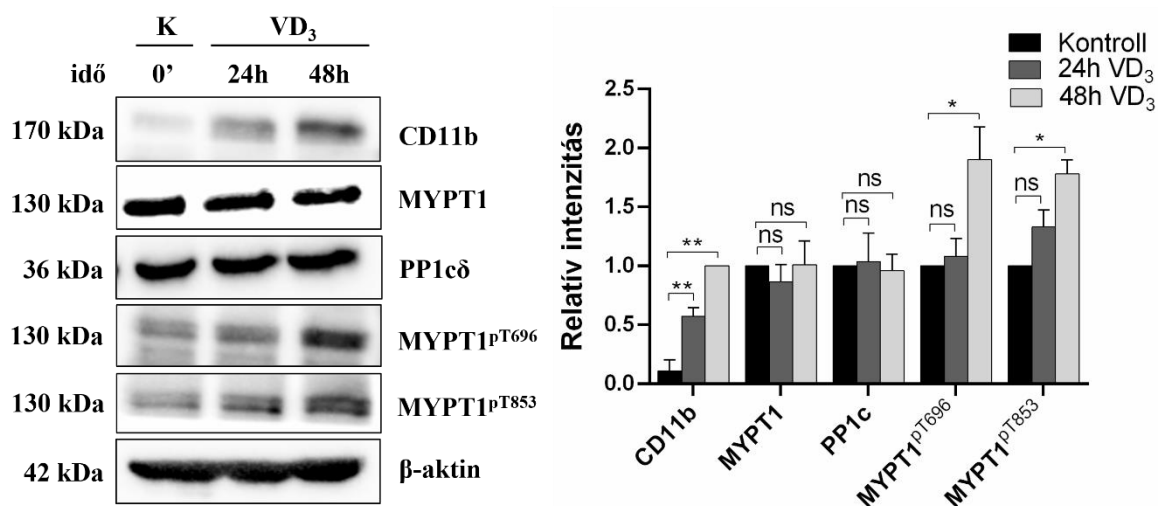


20. ábra A miozin foszfatáz alegységeinek expressziója és foszforilációja THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

THP-1 sejteket 100 nM PMA-val differenciáltattunk 0, 24, ill. 48 órán át, majd a jelölt időpontokban Western blot módszerrel vizsgáltuk a CD11b, MYPT1 és PP1cδ expresszióját, valamint a MYPT1 Thr696 illetve Thr853 oldalláncok foszforilációját a sejtlizátumokban. A MYPT1, PP1cδ és a CD11b expressziós szintjét a β-aktinra, míg a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációját a teljes MYPT1 fehérje mennyiségre normalizáltuk. A hisztogram a MYPT1 és a PP1cδ expressziójának és a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációjának változását mutatja a kiindulási állapothoz képest, míg a CD11b expresszióját a 48 órás mintához viszonyítottuk. Az adatokat kétutas ANOVA-val, illetve post-hoc Dunnett teszttel elemeztük (n = 5, * p < 0,05; ** p < 0,01; ns: nem szignifikáns).

A VD₃ szintén gyakran használt szer monocita eredetű sejtek makrofág differenciációjának indukálására (Donald és mtsai.1983; Barilli és mtsai., 2011), azonban az így keletkezett makrofágok fenotípusosan eltérő jegyeket mutatnak. Bár a VD₃ stimulus nem okoz jellegzetes makrofág fenotípust, a makrofágokra jellemző megnövekedett citoplazma térfogat (Daingneault és mtsai., 2010), megnövekedett lizozim- és nonspecifikus észteráz aktivitás (Murao és mtsai., 1983), megnövekedett fagocitotikus aktivitás (Miyaura és mtsai., 1981), emelkedett szuperoxid felszabadulás (Schwende és mtsai., 1996) VD₃-al stimulált sejteken is megfigyelhető. A PMA stimulussal ellentétben a THP-1 sejtek VD₃-indukálta differenciációját nem kíséri a sejtek letapadása, illetve proliferációs képességük elvesztése, azonban hasonló mértékű CD11b expressziót eredményez (Daingneault és mtsai., 2010; Wu és Miller, 2015). Annak bizonyítására, hogy a MP szerepet játszik a VD₃-indukált makrofág differenciáció szabályozásában is, megvizsgáltuk a MP alegységeinek expresszióját, illetve a regulátor alegység foszforilációs állapotát VD₃-indukált

makrofág differenciáció során (21. ábra), és azt találtuk, hogy a PMA-indukcióhoz hasonlóan 24 illetve 48 óra elteltével sem változott sem a PP1c, sem a MYPT1 expressziója, miközben a CD11b expressziója jelentősen emelkedett, ami a differenciáció végbemenetelére utal. Ezzel párhuzamosan a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációja az idő előrehaladtával fokozatosan emelkedett, ami arra utal, hogy a VD₃-indukálta differenciáció szintén MP gátlással jár együtt. Ezek az adatok alapján a MP gátlása mind a PMA, mind a VD₃-indukálta differenciáció során megfigyelhető.



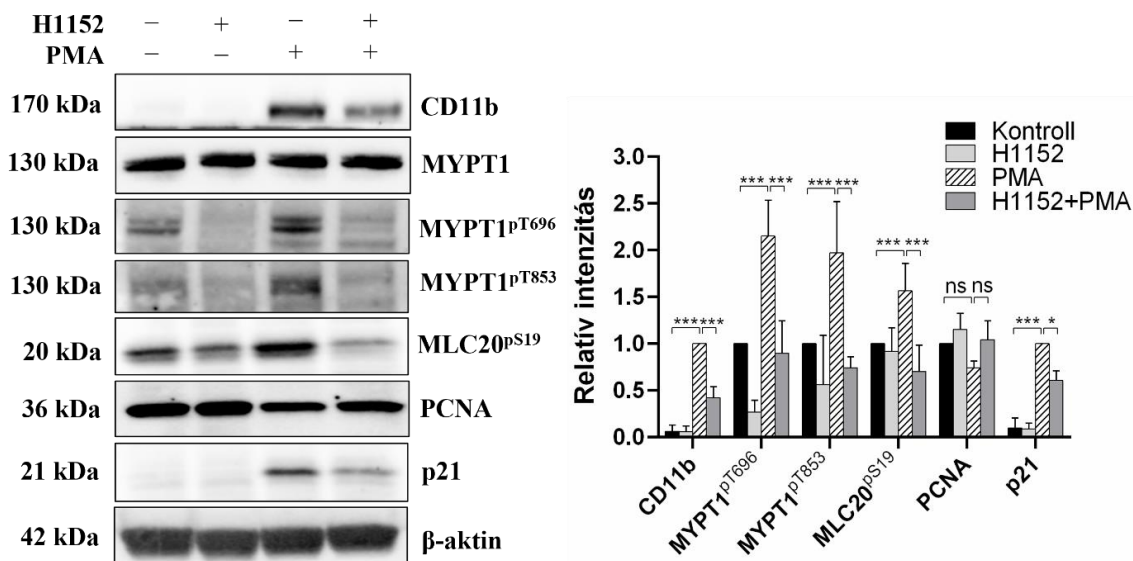
21. ábra A miozin foszfatáz alegységeinek expressziója és foszforilációja THP-1 sejtek VD₃-indukált makrofág differenciációja során.

THP-1 sejteket 100 nM VD₃-al differenciáltattunk 0, 24, ill. 48 órán át, majd a jelölt időpontokban Western blot módszerrel vizsgáltuk a CD11b, MYPT1 és PP1cδ expresszióját, valamint a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációját a sejtizátumokban. A MYPT1, PP1cδ és a CD11b expressziós szintjét a β-aktinra, míg a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációját a teljes MYPT1 fehérjére normalizáltuk. A hisztogram a MYPT1 és a PP1cδ expressziójának és a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációjának változását mutatja a kiindulási állapothoz képest, míg a CD11b expresszióját a 48 órás mintához viszonyítottuk. Az adatokat kétutas ANOVA-val, illetve post-hoc Dunnett teszttel elemeztük (n = 5, * p < 0,05; ** p < 0,01; ns: nem szignifikáns).

4.3.3. H1152 hatása a MYPT1 és MLC20 foszforilációjára, illetve a sejtek proliferációjára THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja során

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a MP farmakológiai aktiválása révén befolyásolható-e a THP-1 sejtek differenciációjának folyamata. Mivel a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncait elsősorban a ROCK foszforilálja, így annak gátlása mérsékelheti a MYPT1 foszforilációját, feloldva ezzel az MP-t a gátlás alól (Grassie és mtsai., 2011). A THP-1 sejteket a ROCK specifikus gátlószerével, H1152-vel (Tamura és mtsai., 2005) előkezeltük, majd 48 óra PMA-indukciót követően vizsgáltuk a MYPT1 foszforilációját. A H1152 csökkentette a MYPT1 foszforilációját a nem differenciáltatott sejtekben, emellett részben megakadályozta a Thr696 és Thr853 oldalláncok

PMA-indukálta foszforilációjának növekedését is (22. ábra). A MP 20 kDa MLC20 szubsztrátja Ser19 oldalláncának foszforilációja is jelentős emelkedést mutatott 48 óra PMA kezelést követően, azonban H1152 előkezelés hatására ez a MP aktivitásával párhuzamosan jelentősen csökkent. Ezen kívül a H1152 kezelés jelentősen csökkentette a CD11b expresszióját is, ami arra utal, hogy a differenciáció hatékonysága összefüggésbe hozható a MP aktivitásával. Megvizsgáltuk két ismert sejtciklus-szabályozó fehérje, a ciklinfüggő kináz inhibitor-1 (p21) és a PCNA fehérjék expresszióját is, melyekről ismert, hogy felelősek a PMA-indukált makrofág differenciációval összefüggő csökkent sejtproliferációért (Traore és mtsai., 2005; Tsai és mtsai., 2016). Az irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a PCNA expressziója PMA kezelés hatására csökken, azonban ez a hatás H1152 előkezeléssel részben megakadályozható volt, bár a PCNA expressziójának változása statisztikailag nem mutatott szignifikáns hatást. A H1152 előkezelés viszont szignifikánsan ellensúlyozta a p21 fehérje szintjének PMA által okozott nagymértékű emelkedését.

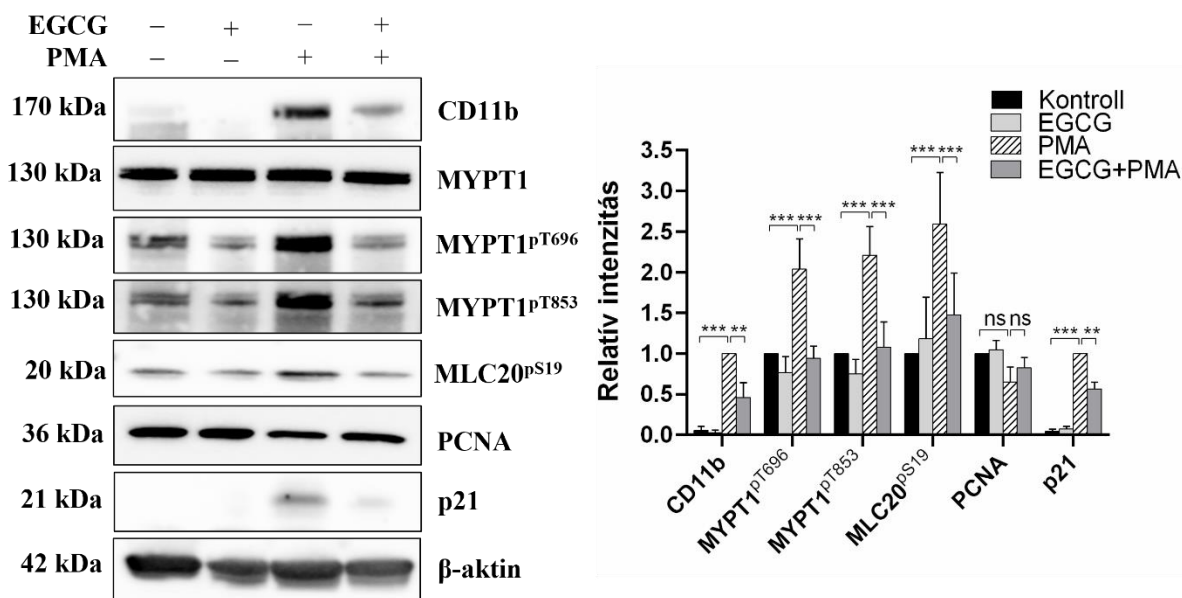


22. ábra H1152 hatása a MYPT1 Thr696, Thr853 és az MLC20 Ser19 oldalláncok foszforilációjára, valamint a CD11b, p21 és PCNA marker fehérjék expressziójára THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

A THP-1 sejteket 10 μ M H1152-vel 30 percen át előkezeltük, majd 100 nM PMA-val differenciáltattuk további 48 órán át és Western blot módszerrel vizsgáltuk a CD11b, p21 és PCNA fehérjék expressziójának, valamint a MYPT1 Thr696, Thr853 és az MLC20 Ser19 oldalláncok foszforilációjának változását. A MYPT1, PCNA, p21 és a CD11b expressziós szintjét a β -aktinra, míg a MYPT1 Thr696 és MYPT1 Thr853 oldalláncok foszforilációját a teljes MYPT1 fehérjére normalizáltuk. A hisztogram a MYPT1 Thr696, Thr853 és az MLC20 Ser19 oldalláncok foszforilációjának változását mutatja a kezeltlen sejtekhez képest, míg a CD11b és p21 fehérjék expresszióját a 48 órán át PMA-val kezelt mintához viszonyítottuk. Az adatokat kétutas ANOVA-val, illetve post-hoc Tukey-tesztel elemeztük ($n = 5$; $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns: nem szignifikáns).

4.3.4. Az EGCG hatása a MYPT1 és MLC20 foszforilációjára és a sejtek proliferációjára THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja során

Ismert, hogy a MP alternatív módon aktiválható a MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek defoszforilációjáért felelős foszfatázok aktivitásának fokozásával is (Tsukamoto és mtsai., 2014; Batori és mtsai., 2017). Munkánk első részében kimutattuk, hogy az EGCG/67LR/PP2A útvonal THP-1 sejtekben is működik, tehát az EGCG – a 67 kDa laminin receptoron keresztül – a PP2A stimulációja révén a MYPT1 Thr696 oldallánc defoszforilációját indukálni, ezáltal a holoenzimet aktiválni képes. Az alkalmazott differenciációs modellben mind a MYPT1 Thr696, mind a Thr853 oldalláncok foszforilációja csökkent, ha a sejteket a PMA-indukció előtt EGCG-vel kezeltük (23. ábra). Ezt a defoszforiláció által kiváltott MP aktiválódást a MLC20 foszforilációjának csökkenése, a CD11b és p21 fehérjék alacsonyabb expressziója, valamint a PCNA szintjének részleges helyreállása követte. Ezen adatok alátámasztják hipotézisünket, miszerint a MP aktiválása akadályozhatja a PMA-indukált makrofág differenciáció folyamatát THP-1 sejtekben.

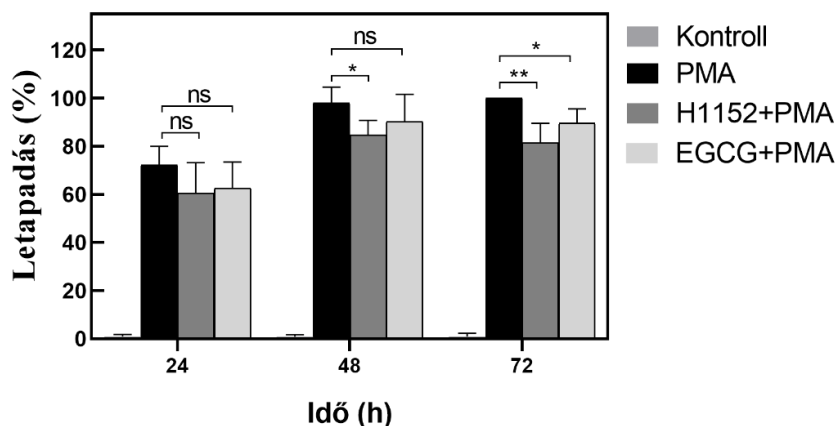


23. ábra EGCG hatása a MYPT1 Thr696 és Thr853, valamint az MLC20 Ser19 oldalláncainak foszforilációjára és a CD11b, p21 és PCNA marker fehérjék expressziójára THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

A THP-1 sejteket 20 μ M EGCG-vel 1 órán át előkezeltük, majd 100 nM PMA-val differenciáltattuk további 48 órán át és Western blot módszerrel vizsgáltuk a CD11b, p21 és PCNA fehérjék expressziójának, valamint a MYPT1 Thr696 és Thr853 és az MLC20 Ser19 oldalláncok foszforilációjának változását. A MYPT1, PCNA, p21 és a CD11b expressziós szintjét a β -aktinra, míg a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációját a teljes MYPT1 fehérjére normalizáltuk. A hisztogram a MYPT1 Thr696, Thr853 és az MLC20 Ser19 oldalláncok foszforilációjának változását mutatja a kezeltlen sejtekhez képest, míg a CD11b és p21 fehérjék expresszióját a 48 órán át PMA-val kezelt mintához viszonyítottuk. Az adatokat kétutas ANOVA-val, illetve post-hoc Tukey-tesztel elemeztük ($n = 5$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ ns: nem szignifikáns).

4.3.5. A miozin foszfatáz hatása a differenciálódó makrofágok letapadási képességére

Ezt követően szulforodamin B (SRB) teszttel megvizsgáltuk a MP aktiválásának hatását a sejtek letapadására, amely a makrofág differenciáció egyik jellegzetes velejárója. Ehhez a THP-1 sejteket H1152 vagy EGCG jelenlétében, illetve hiányában PMA alkalmazásával differenciáltattuk 24, 48, illetve 72 órán keresztül, majd a megjelölt időpontokban a le nem tapadt sejteket PBS-el történő mosással eltávolítottuk és a minták fehérjetartalmát, amely a letapadt sejtek számával korrelál, triklórecetsavas kicsapást és SRB-vel történő festést követő abszorbanciaméréssel határoztuk meg (24. ábra). A kezeletlen sejtek letapadásának mértéke 72 óra elteltével is elhanyagolható volt, míg a PMA-stimulált sejtek letapadása az idő előrehaladtával folyamatosan nőtt, 72 óra elteltével elérve a maximumot. Az eredmények kiértékelése során a 72 órán keresztül PMA-val stimulált sejtek abszorbanciáját tekintettük 100%-nak. A letapadó sejtek százalékos aránya H1152 illetve EGCG jelenlétében a mérés minden egyes időpontjában alacsonyabb volt, mint a kizárólag PMA kezelt sejteké, a letapadás szignifikáns mértékű csökkenése pedig 72 óra elteltével volt kimutatható.

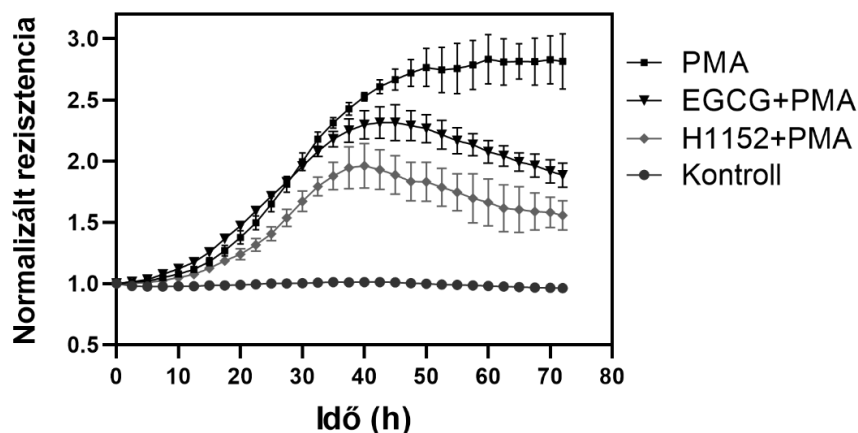


24. ábra H1152 és EGCG hatása a letapadási képességre THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

A sejteket 10 μ M H1152-vel 30 percen át, illetve 20 μ M EGCG-vel 1 órán át előkezeltük, majd további 24, 48 vagy 72 órán át 100 nM PMA jelenlétében differenciáltattuk. A le nem tapadt sejteket a jelzett időpontokban eltávolítottuk, a maradékot pedig a fehérjetartalom triklórecetsavval történő kicsapását követően szulforodamin B-vel festettük. A sejtek letapadási képességét az 515 nm-en mért abszorbanciaértékek segítségével számszerűsítettük, a 72 órán át kizárólag PMA-val stimulált sejtek letapadásának mértékét véve 100 %-nak. A hisztogramok 3 független mérés átlagát reprezentálják. Az adatokat t-tesztel elemeztük (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ ns: nem szignifikáns).

Annak érdekében, hogy a THP-1 sejtek differenciációjának mértékét valós időben számszerűsíteni tudjuk, ún. elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés (ECIS) módszert alkalmaztunk (25. ábra). Az ECIS rendszer a tenyésztőedény alján elhelyezkedő elektródák közötti

ellenállásváltozást méri, amely a sejtek felszínhez történő tapadásának erősségével arányos (Kataoka és mtsai., 2002; Smith és mtsai., 2018).



25. ábra H1152 és EGCG hatása a sejtek letapadásának erősségére THP-1 sejtek PMA-indukált makrofág differenciációja során

A sejteket 10 μ M H1152-vel 30 percen át, illetve 20 μ M EGCG-vel 1 órán át előkezeltük, majd további 72 órán keresztül 100 nM PMA jelenlétében differenciáltattuk 8-lyukú ECIS lemezeken. A sejtek letapadásának erősségét valós időben, ECIS készülékkel monitoroztuk. Az ábrázolt normalizált rezisztencia a sejtek letapadásának erősségével arányos. A rezisztencia méréseket percenként végeztük, a hisztogram egy reprezentatív mérésből származó 3 független minta átlagát mutatja. Az adatokat kétutas ANOVA-val és Dunnett-féle poszt-hoc teszttel elemeztük ($n = 3$ * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ ns: nem szignifikáns).

Kezeletlen sejtek esetén a normalizált rezisztencia 72 óra alatt nem változott számottevően, míg a PMA-stimuláció a rezisztencia fokozatos növekedésével járt együtt, ami bizonyítja a rendszer alkalmazhatóságát, mint a makrofág differenciáció nyomonkövetésére szolgáló módszer. A THP-1 monociták H1152-vel történő előkezelése csökkentette a PMA-indukált makrofág differenciáció sebességét és számottevően alacsonyabb szintű adherenciát, valamint instabil makrofág-fenotípust eredményezett, amit a 48 óra elteltével tapasztalható nagymértékű rezisztenciacsökkenés mutatott. EGCG jelenlétében a differenciáció kinetikája kezdetben (kb. 30 óráig) hasonló volt, mint a kizárólag PMA-val stimulált sejtek esetén, azonban a letapadás gyengébb volt (kisebb maximális rezisztencia érték), és 48 óra elteltével jelentősen csökkenni kezdett. Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy a MP aktiválásával a PMA-indukált makrofág differenciáció hatékonysága gátolható.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során tanulmányoztuk a potenciális PP1 gátló fehérje, a LIMK2v1 foszfatázgátló tulajdonságait és azonosítottuk az ahhoz szükséges foszforilációs helyet. Bizonyítottuk a PP1 családba tartozó MP enzim THP-1 leukémiás sejtek kemoszenzitivitásában, illetve monociták makrofág differenciációjának folyamatában betöltött jelentős szerepét.

A LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata

A LIM kinázok számos sejtfunkció szabályozásában vehetnek részt, mint a sejtmotilitás, sejtosztódás, differenciáció, apoptózis vagy tumorigenezis (Prunier és mtsai., 2017; Manetti 2012). A LIMK2 három izoformájának funkcionális különbségeiről meglehetősen keveset tudunk, egyes adatok azonban arra utalnak, hogy az említett izoformák valószínűleg nem teljesen átfedő funkciókkal rendelkeznek, mivel mind szöveti, mind szubcelluláris előfordulásuk eltér, valamint egyes fejlődési stádiumokban is eltérő mértékben expresszálódnak (Nomoto és mtsai., 1999; Osada és mtsai., 1996). Kiderült, hogy a LIMK2b és LIMK2v1 a tumorszupresszor p53 gén targetjei, amely DNS károsodás hatására a LIMK2b és LIMK2v1 mRNS szintű expressziójának növekedését váltja ki, befolyásolva ezzel a G2/M átmenetet (Croft és mtsai., 2011; Hsu és mtsai., 2010). Munkánk során a legkevésbé ismert LIMK2v1 izoformát vizsgáltuk, amely szerkezetét tekintve a C-terminális PP1-gátló szekvencia jelenlétében különbözik a többi izoformától.

A Flag-LIMKv1 fehérje CPI-17-szerű oldalláncon történő *in vitro* foszforilációjának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy *in vitro* körülmények között mind a PKC, mind a ROCK foszforilálják a LIMK2v1-t a CPI-17-szerű helyen. Ismert, hogy a ROCK képes a LIMK2 mindhárom izoformáját foszforilálni, LIMK2a esetén a Thr505, LIMK2b és LIMK2v1 esetén a Thr484 oldalláncokon (Sumi és mtsai., 2001), azonban a CPI-17-szerű helyen történő ROCK általi foszforilációról ezidáig egyetlen tanulmány sem számolt be. A LIMK2a Thr505 oldalláncának ROCK általi foszforilációja növeli az enzim affinitását a kofilin iránt (Sumi és mtsai., 2001), ugyanakkor a LIMK2v1 Thr484 oldallánc ROCK általi foszforilációjának fiziológiai jelentősége nem ismert, ugyanis a LIMK2v1 a többi izoformával ellentétben közvetlenül nem foszforilálja a kofilint (Vallée és mtsai., 2018). A LIMK2a PKC általi foszforilációjáról is beszámoltak már a Ser283 illetve a Thr494 oldalláncokon, amely megakadályozta a LIMK2a sejtmagba történő

importját (Goyal és mtsai., 2005; Goyal és mtsai., 2006), a LIMK2v1 PKC általi foszforilációját azonban ezidáig nem vizsgálták.

Sejtes rendszerben a ROCK inhibitor H1152-vel végzett előkezelések alátámasztották korábbi eredményeinket, miszerint a ROCK részt vesz a LIMK2v1 CPI-17-szerű oldalláncának foszforilációjában, ugyanis tsA201 sejtekben a H1152 kezelés jelentősen csökkentette a Flag-LIMK2v1 CPI-17-szerű oldalláncának CLA jelenlétében megfigyelhető emelkedett foszforilációját. Ezzel szemben sem a GF109230x, sem a Gö6983 PKC inhibitorokkal végzett előkezelések nem befolyásolták a fehérje CLA jelenlétében megfigyelhető CPI-17-szerű oldalláncan történő foszforilációját. Ez az eredmény alátámasztja korábbi megfigyeléseinket, miszerint tsA201 sejtekben a PKC aktivátor PMA-val nem sikerült a LIMK2v1 CPI-17-szerű oldalláncának foszforilációját indukálnunk, tehát az *in vitro* eredményekkel ellentétben élő sejtekben a PKC nem foszforilálja a LIMK2v1 CPI-17-szerű oldalláncát.

A Thr596 oldallánc helyett nem foszforilálható alanin (Thr596A) vagy a foszforilációt mimikáló glutaminsav (Thr596E) aminosavakat hordozó mutáns Flag-LIMK2v1-val végzett immunprecipitációs kísérleteink azt mutatják, hogy a vad típusú Flag-LIMK2v1 CLA jelenlétében detektálható emelkedett foszforilációja a Thr596 oldalláncán következik be, ugyanis az immunprecipitált Thr596A mutáns fehérje esetén a kérdéses foszforiláció CLA jelenlétében nem volt detektálható.

A LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy kismértékben a foszforilálatlan fehérje is csökkentette a PP1c foszfatáz aktivitását 100-200 nM koncentrációtartományban, míg a tiofoszforilált Flag-LIMK2v1 már 10 nM koncentrációban hasonló mértékű foszfatázgátló hatást fejtett ki, míg 200 nM koncentrációban alkalmazva már 10%-ra csökkentette a PP1c aktivitását. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a LIMK2v1 foszfatázgátló hatása a CPI-17 fehérjecsalád tagjaihoz hasonlóan foszforiláció révén jelentősen megnő.

Napjainkban egyre több bizonyíték van arra, hogy a LIMK2 szerepet játszhat a daganatkialakulás és áttétképződés folyamatában (Manetti 2012; Suyama és mtsai., 2004; Vlecken és Bagowski, 2009), mindezek pedig arra utalnak, hogy a LIMK2v1 a protein foszfatázok gátló hatású szabályozójaként a daganatok kezelésének új terápiás célpontjaként szolgálhat.

A miozin foszfatáz szerepe THP-1 sejtek kemoszenzitivitásának szabályozásában

A PP1 és PP2A fokozott aktivitását már több munkacsoport is bizonyította a kemoterápiás szerek apoptózist indukáló hatásának vonatkozásában (Ruvolo és mtsai., 2001; Wang és mtsai., 2001; Narla és mtsai., 2018), ami arra utal, hogy a protein foszfatázok aktivitásváltozásának kiemelt jelentősége van e folyamatok szabályozásában, azonban pontos szerepük még nem minden részletében tisztázott. Az is ismert, hogy a PP1 és PP2A gátlószerei számos daganatellenes szer sejthalált kiváltó hatását mérséklék (Kiss és mtsai., 2008; Dedinszki és mtsai., 2015; Mazhar és mtsai., 2019), ezért feltételezhető, hogy a foszfatáz aktiváló vegyületek növelhetik a rákos sejtek érzékenységét a kemoterápiás szerekkel szemben. A PP2A és a MP receptor-mediált módon történő aktiválására képes EGCG-ről jól ismert, hogy antiproliferatív hatással bír és javítja a kemoterápiás szerek tumorelles hatását (Cao és mtsai., 2016); azonban keveset tudunk arról, hogy az EGCG által kiváltott foszfatáz-aktiváció hogyan járul hozzá annak sejtnövekedést gátló hatáshoz.

Ismert, hogy az EGCG a 67LR/PKA/PP2A útvonalon keresztül aktiválja az MP-t. Az EGCG-receptor 67LR számos daganattípusban (Menard és mtsai., 1997), többek között myeloid leukémiában is (Britschgi és mtsai., 2010) túlexpresszált, és fontos szerepet játszik az EGCG által indukált apoptózisban (Britschgi és mtsai., 2010; Kumazoe és mtsai., 2013). A 67LR jelenlétét THP-1 sejtekben korábban már leírták (Montuori és mtsai., 1999). Eredményeink azt mutatják, hogy az EGCG/67LR/PKA/PP2A útvonal komponensei THP-1 sejtekben mind jelen vannak, a receptor mind a citoplazmában, mind a sejtmagban megtalálható, azonban jelentős része a plazmamembrán régióban lokalizálódik, ami ezekben a sejtekben érzékenységet kölcsönözhet az EGCG-re. A sejtfelszíni receptor diffúz citoplazmatikus és sejtmagi lokalizációjának oka feltehetően a 67LR 37 kDa méretű prekursor fehérjéjének (37LR) jelenléte. A 67LR forma elsősorban a plazmamembránban lokalizálódik, citoszolikus szintje alacsony, míg a 37LR előfordulása a membránban nem valószínű, ugyanakkor a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt megtalálható (DiGiacomo, 2016). A 37LR sejtmagi jelenléte feltehetően részben a sejtmagi pre-40S riboszómákkal és kis nukleoláris riboproteinekkal, valamint kromatinnal való asszociációjával magyarázható (O'Donohue et al., 2010; Venticinque & Meruelo, 2012). Az általunk alkalmazott antitest mind a 37LR, mind a 67LR formákat detektálni képes. Az immunfluoreszcens jelölést permeabilizált sejteken végeztük, így a sejtfelszíni és az intracelluláris 37/67LR formákat egyaránt detektáltuk.

A THP-1 sejtek 5 μ M EGCG-vel történő kezelése önmagában nem volt jelentős hatással a sejtek életképességére a hosszú távú inkubációk során (24-48 óra), azonban 4 óra elteltével jelentősen (de statisztikailag nem szignifikánsan) csökkentette a MYPT1 Thr696 oldalláncának foszforilációját, ami arra utal, hogy ez a koncentráció elegendő a 67LR/PKA/PP2A jelátviteli tengely beindításához ezekben a sejtekben.

Más munkacsoportok korábban már feltételezték a pRb-E2F útvonal részvételét az EGCG antiproliferatív hatásában. Epitél sejtekben kimutatták a pRb expressziójának és/vagy foszforilációjának csökkenését EGCG-kezelés hatására (Ahmad és mtsai., 2002; Liberto és mtsai., 2000). E tanulmány szerint a pRb foszforilációjának csökkenése EGCG jelenlétében a ciklinfüggő kináz (CDK) inhibitor, valamint a p21 indukciójának és a ciklin D1-hez társuló pRb kináz aktivitás gátlásának köszönhető. Saját kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a THP-1 sejtek EGCG-vel történő kezelése önmagában nem okozott jelentős változást sem a p21, sem a ciklin D1 expressziójában, ami megkérdőjelezi a kinázgátlás szerepét a csökkent pRb-foszforiláció hátterében. Megfigyeléseinket alátámasztva más munkacsoport is kimutatta, hogy myeloid leukémiás sejtekben a zöld tea kivonat nem befolyásolja a CDK-k és a CDK-inhibitorok expresszióját, azonban a pRb defoszforilációját és a pRb-E2F komplexek szintjének emelkedését figyelték meg (Henry és mtsai., 2019).

Kísérleteink során a DNR szubletális dózist alkalmaztuk, ami önmagában alacsony szintű sejthalált okozott, ezzel párhuzamosan azonban a pRb Thr826 jelentős defoszforilációját indukálta, ami EGCG jelenlétében tovább fokozódott. A pRb Thr826 defoszforilációját mind a DNR, mind az EGCG kezelés hatására megfigyeltük, ami részben magyarázatot adhat a kombinált kezelés hatására bekövetkező fokozott mértékű sejthalálra. Mivel a MYPT1 Thr696 oldalláncának foszforilációja a MP aktivitását gátolja, az EGCG jelenlétében megfigyelt MYPT1 Thr696 defoszforiláció és az ezt követő MP aktiválás magyarázhatja a pRb Thr826 oldallánc foszforilációjának csökkenését az EGCG-vel és EGCG+DNR-rel kezelt sejtekben.

Az EGCG-vel kombinált DNR kezelés hatására megfigyeltük a merlin tumorszupresszor fehérje Ser518 oldalláncának defoszforilációját is, amely a fehérje Hippo jelátviteli útvonalon keresztül zajló sejtnövekedést gátló funkciójához szükséges. Az irodalomban nem találhatók a merlin hematológiai kórképekben betöltött lehetséges szerepére vonatkozó adatok, azonban leukémiás sejtekben a Hippo útvonal hibás működéséről, valamint a Hippo transzducer YAP fehérje abnormális expressziójáról számoltak be (Han, 2019; Wu és mtsai., 2018). A merlin EGCG hatására

bekövetkező defoszforilációját melanoma sejtekben is kimutatták, amely munkacsoport részletesen vizsgálta a PP2A és MP e folyamatban betöltött szerepét (Tsukamoto és mtsai., 2014). Eredményeink alapján az EGCG önmagában a merlin Ser518 oldalláncának csekély mértékű defoszforilációját okozta, míg a DNR kezelésnek gyakorlatilag nem volt hatása. A merlin foszforilációs szintjének kombinált kezelés hatására megfigyelhető nagymértékű csökkenése viszont hozzájárulhat a jelentősen csökkent sejtproliferációhoz.

A miozin foszfatáz szabályozó szerepe a makrofág differenciációban

A makrofág differenciáció különböző jelátviteli kaszkádok által közvetített komplex folyamat, melynek nem megfelelő végbemenetelére számos humán megbetegedés vezethető vissza (Karlmark és mtsai., 2012). Így például a túlzott mértékű makrofág differenciáció ateroszklerózishoz, azaz ún. ateroszklerotikus plakkok kialakulásával járó krónikus gyulladásos állapothoz vezethet (Ley és mtsai., 2011), amelyben a makrofágok számos különböző és meglehetősen fontos szerepet töltenek be: részt vesznek a koleszterin ateroszklerotikus léziókban történő felhalmozódásában, hozzájárulnak a szöveti regenerációhoz és átalakuláshoz, valamint a plakkok stabilizálásához (Bobryshev és mtsai., 2016). A makrofágok ezért vonzó célpontot jelentenek az antiateroszklerotikus terápia fejlesztéséhez, amelynek célja lehet a monociták elváltozás helyére történő toborzásának csökkentése, a proinflammatorikus makrofágok gátlása vagy a gyulladáscsökkentő válaszok és a koleszterin kiáramlásának serkentése.

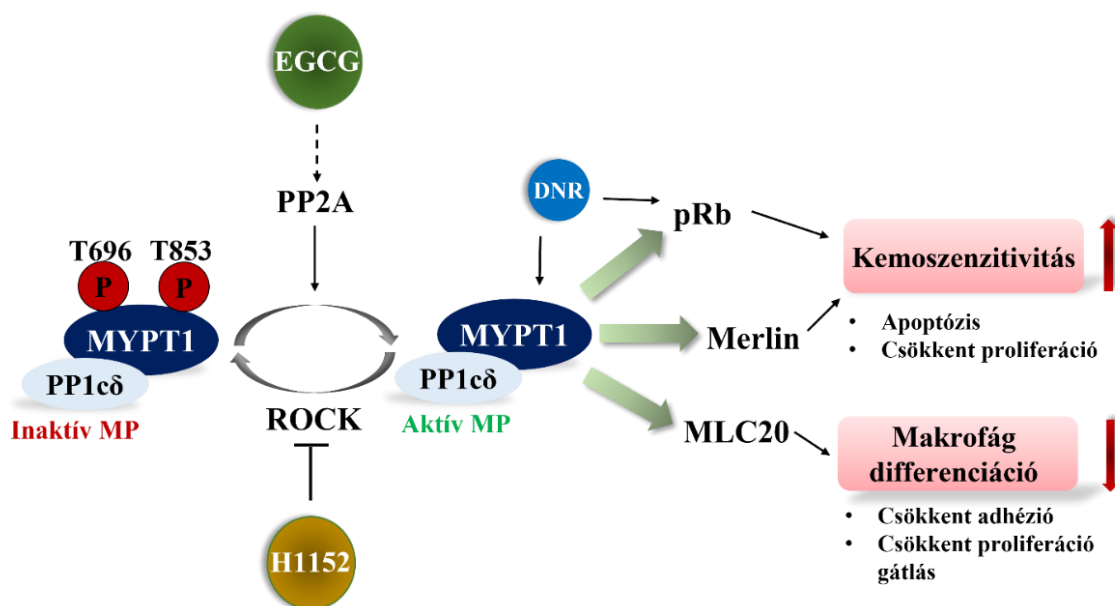
A protein kinázok és foszfatázok a sejtek jelátviteli folyamatainak fontos szabályozóiként szerepet játszhatnak e folyamat irányításában is. A Ser/Thr-specifikus foszfatázok szerepe különböző sejtfolyamatok szabályozásában részletesen dokumentált; azonban kevés tanulmány mutatja be a foszfatázok részvételét a makrofág differenciáció szabályozásában. Korábban kimutatták, hogy a VD₃ stimulus a PP2C (Nishikawa és mtsai., 1995) és a calcineurin (Omay és mtsai., 1996) upregulációjához, valamint a PP1 izoenzimek sejtszintű újraeloszlásához (Omay és mtsai., 1995) vezetett HL-60 sejtekben, ennek fiziológiai jelentőségét és a szubsztrátfehérjéket azonban nem azonosították. Egy nemrégiben készült tanulmány igazolta a PP2C szerepét az Akt és STAT1 szignálok downregulációjától függő mechanizmuson keresztül a makrofág differenciáció negatív szabályozójaként (Smith és mtsai., 2018). A PP1 és PP2A gátló kalikulin A (CLA) fokozta a VD₃-indukált differenciáció mértékét, ami e foszfatázok részvételére is utal (Omay és mtsai., 1995), a PP1 és a PP2A feltételezett szabályozó alegységei azonban továbbra sem ismertek.

Nemrégiben kimutatták, hogy a PMA-indukált makrofág differenciáció a ROCK aktivációját igényli (Bhattacharja és mtsai., 2020; Yang és mtsai., 2017), amely a specifikus szubsztrátok (MLC20, ezrin/radixin/moezin, adducin) foszforilációján keresztül részt vesz a citoskeletális folyamatok szabályozásában (Amano és mtsai., 2010). E fehérjék foszforilációs szintjét kooperatív módon elsősorban a ROCK és MP szabályozza a citoskeletális átrendeződéssel járó folyamatokban (Xia és mtsai., 2005; Fukata és mtsai., 1998). Mindemellett munkacsoportunk nemrégiben kimutatta a ROCK és MP részvételét az epidermális keratinociták sebgyógyulási folyamatának közvetítésében (Horváth és mtsai., 2018). Eredményeink azt mutatják, hogy a PMA-indukált makrofág differenciációhoz nemcsak a ROCK aktiválása, hanem a MP egyidejű gátlása is szükséges. Az MLC20 által közvetített aktomiozin átrendeződés a monociták makrofágokká történő differenciálódásához alapvető fontosságúnak tűnik (Bhattacharja és mtsai., 2020). Ezzel összhangban a MLC20 foszforilációjának szignifikáns emelkedését figyeltük meg PMA-stimuláció hatására THP-1 sejtekben (17. ábra). Ez arra utal, hogy a MLC20 foszforilációs szintjének fenntartásához a ROCK aktiválása és a MP gátlása egyaránt szükséges. A MP gátlása részben a MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek ROCK általi foszforilációja révén valósul meg. Ennek megfelelően a ROCK-inhibitor H1152 alkalmazása a PMA-stimulációt megelőzően szignifikánsan csökkentette mind a MYPT1, mind az MLC20 foszforilációját, valamint a monociták differenciálódási képességét, amelyet a makrofág differenciációs markerként alkalmazott CD11b alacsonyabb expressziós szintje, a proliferáció-gátlás mérséklődése és a sejtek csökkent letapadási képessége egyaránt jól jelzett.

Az EGCG a MYPT1 defoszforilációja révén a 67LR/PKA/PP2A útvonalon keresztül a MP aktiválására képes (Tsukamoto és mtsai., 2014; Batori és mtsai., 2017). Emellett az EGCG-nek számos farmakológiai hatása ismert, beleértve kardiovaszkuláris protektív hatásait is (Babu és Liu 2008), sőt egyes tanulmányok az EGCG kezelés hatékonyságáról számoltak be az ateroszklerózis terápiájában, azonban ennek molekuláris mechanizmusáról keveset tudunk (Eng és mtsai., 2018). PMA-differenciált makrofágokban kimutatták, hogy az EGCG a 67LR-on keresztül csökkenti a mátrix metalloproteinázok expresszióját, ami az ateroszklerotikus plakkok stabilizálásához vezethet (Wang és mtsai., 2016). Ahogyan az saját vizsgálatainkból kiderült, a THP-1 sejtek PMA-stimulációt megelőző EGCG kezelése jelentősen csökkentette a MYPT1 gátló helyeinek foszforilációját, aktiválva ezzel a holoenzimet, illetve csökkentette a MLC20 Ser19 oldalláncának foszforilációját. Figyelembe véve a MLC20 foszforilációs állapotának makrofág differenciációban

betöltött fontos szerepét, eredményeink az EGCG anti-ateroszklerotikus hatásait illetően hasznos új információkkal szolgálhatnak.

Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy a MP aktiválása akár a 67LR/PKA/PP2A útvonalon, akár a ROCK gátlása révén kiváltható és az enzim aktiválása a THP-1 leukémiás sejtek DNR-el szembeni megnövekedett kemoszenzitivitásában, illetve csökkent mértékű makrofág differenciációban nyilvánul meg. Előbbi hatását a tumorszupresszor pRb és merlin szubsztrátok, míg differenciáció-gátló hatást a MLC20 defoszforilációján keresztül fejt ki. A kemoszenzitivitás fokozódása megnövekedett apoptózis-indukcióban nyilvánul meg, melyet a PARP fehérje hasadásának emelkedett szintje mutat, emellett a sejtek csökkent proliferációs képessége jellemző, amit a PCNA fehérje csökkent expressziója jelez. A gátolt makrofág differenciáció egyrészt a sejtek csökkent adhézis képességében, másrészt csökkent proliferáció gátlásban nyilvánul meg, melyet a PCNA expressziójának emelkedett szintje, valamint a p21 expresszió csökkenése egyaránt jól mutat.



26. ábra A miozin foszfatáz aktiválásának hatása THP-1 sejtek kemoszenzitivására és makrofággá történő differenciációjára

A miozin foszfatáz aktiválásával a retinoblasztóma és merlin fehérjék defoszforilációja révén a THP-1 sejtek kemoszenzitivitása fokozható, ami csökkent proliferációt és fokozott apoptózist vált ki. A MLC20 defoszforilációja révén a makrofág differenciáció folyamata gátolható, ami a sejtek csökkent adhéziojában és a proliferáció gátlás csökkenésében nyilvánul meg. MYPT1: miozin foszfatáz regulátor alegység, PP1cδ: protein foszfatáz-1 katalitikus alegység, EGCG: epigallokatechin-3-gallát, PP2A: protein foszfatáz-2A, ROCK: RhoA-aktivált kináz, DNR: daunorubicin, pRb: retinoblasztóma fehérje, MLC20: miozin könnyűlánc.

Eredményeink hasznos új információkkal szolgálhatnak a daganatos sejtek kemoterápiás szerekekkel szembeni érzékenységeinek fokozását célzó terápiás lehetőségek fejlesztéséhez, lehetővé

tehetik az alkalmazott szerek dózisának csökkentését, ezáltal a mellékhatások előfordulási gyakorisága vagy súlyossága mérsékelhető. Emellett a MP új célpontja lehet a túlzott makrofág differenciációval járó megbetegedések, például az érlemeszesedés terápiájának is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A kísérleteink során modell enzimként használt miozin foszfatáz (MP) protein foszfatáz-1 (PP1) katalitikus alegységből (PP1c) és egy ún. “célra irányító” funkciót ellátó regulátor alegységből (MYPT1) épül fel, amely számos sejtfolyamat szabályozásában játszik fontos szerepet. Munkánk során tanulmányozni kívántuk a LIM kináz-2 fehérje 1-es izoformájának (LIMK2v1) foszfatázgátló tulajdonságait, valamint a MP szerepét a daganatos sejtek kemoszenzitivitásának és a monociták makrofág differenciációjának szabályozásában.

Eredményeink szerint a PP1 gátló 17 kDa PKC által aktivált inhibitor (CPI-17) fehérjében található gátló foszforilációs szekvenciát tartalmazó LIMK2v1 *in vitro* RhoA által aktivált kináz (ROCK) és protein kináz C (PKC) enzimek által foszforilálódik a Thr596 oldalláncon, ami a LIMK2v1 PP1 gátló hatását sokszorosára fokozza. Sejtes rendszerben a ROCK szerepét azonosítottuk ezen oldallanc foszforilációjában. Bár a LIMK2v1 fiziológias szerepéről egyelőre keveset tudunk, feltehetően a tumor promóterként is ismert CPI-17-szerű fehérjékhez hasonlóan funkcionálhat, ezek alapján pedig a daganatos sejtek jelátviteli folyamatainak új célpontja lehet.

Kimutattuk, hogy az EGCG szubletális dózisú DNR-el kombinációban alkalmazva fokozza a THP-1 leukémiás sejtek kemoterápiás szerrel szembeni érzékenységét, míg önmagában nincs számottevő hatása a sejtek életképességére. Ezzel párhuzamosan a sejtek proliferációjában csökkenést, míg az apoptózis markerként alkalmazott hasított poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) expressziójában emelkedést tapasztaltunk. Ennek háttérében feltehetően a MYPT1 Thr696 oldallancának csökkent foszforilációja állhat, amely az enzim aktiválását eredményezi, ezáltal pedig a THP-1 sejtek DNR-el szembeni érzékenysége fokozható, ami a tumorszupresszor pRb és merlin fehérjék aktivációjára vezethető vissza. E kombináció lehetővé teszi az alkalmazott szerek dózisának, ezzel együtt a nemkívánatos mellékhatások kockázatának csökkentését is.

Kimutattuk továbbá, hogy a THP-1 monociták foszfatáz aktivitása a makrofág differenciáció során folyamatosan csökken, ami arra utal, hogy a foszfatázok gátlása szükséges a differenciáció végbemeneteléhez. Eredményeink alapján a differenciáció során a MP alegységeinek expressziója nem változik, azonban a MYPT1 foszforilációja a gátló helyeken jelentősen fokozódik, ami H1152, illetve EGCG előkezelés hatására jelentősen mérséklődik, és együtt jár a miozin könnyűlánc (MLC20) Ser19 foszforilációjának csökkenésével is. Igazoltuk, hogy a MP aktiválása révén mind a sejtproliferáció-csökkenés mértéke, mind a sejtek letapadási képessége mérséklődött, ezáltal a MP a túlzott makrofág-differenciációval járó kórképek terápiájának hasznos célpontja lehet.

SUMMARY

Myosin phosphatase (MP), composed of a protein phosphatase-1 (PP1) catalytic (PP1c)- and a 'targeting' regulator subunit (MYPT1) and used as a model enzyme in our experiments, is involved in the regulation of several cellular processes. We aimed to investigate the phosphatase inhibitory properties of a LIM kinase-2 isoform (LIMK2v1) as well as to study the roles of MP in the regulation of the chemosensitivity of malignant cells and in the differentiation of monocytes to macrophages.

LIMK2v1 includes inhibitory phosphorylation sequence, present in the C-kinase potentiated PP1 inhibitor of 17 kDa (CPI-17)-like proteins, and it is phosphorylated by Rho-A associated protein kinase (ROCK) and protein kinase C (PKC) on the Thr596 residue *in vitro*. This phosphorylation increased the PP1 inhibitory effect of LIMK2v1. In cellular systems, we identified the role of ROCK enzyme in the phosphorylation of Thr596. Although, little is yet known about the physiological role of LIMK2v1, it is hypothesized that it may function in a similar manner to members of the CPI-17-like protein family, suggesting that it may be a novel target in signaling of malignant cells.

We have shown that epigallocatechin-3-gallate (EGCG) used in combination with sublethal doses of DNR, enhances the sensitivity of leukaemic cells to chemotherapeutic agents, while itself has no significant effect on cell viability. In parallel, we observed a decrease in cell proliferation and an increase in the expression of cleaved poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) protein, a marker of apoptosis. The above effects is due to reduced inhibitory phosphorylation of MYPT1 at Thr696, which results in activation of the holoenzyme, leading to increased sensitivity of THP-1 cells to DNR and to activation of the tumour suppressor proteins pRb and merlin. This drug combination may allow a reduction in the dose of the agents used, with a concomitant reduction in the risk of undesirable side effects.

We have shown that the phosphatase activity of THP-1 monocytes decreases during macrophage differentiation, suggesting that inhibition of phosphatases is necessary for the differentiation to proceed. The expression of MP subunits was not altered during differentiation, but MYPT1 phosphorylation at the inhibitory sites was significantly increased, which was attenuated by pretreatment with the ROCK inhibitor H1152 or EGCG. The latter was also accompanied by a decrease in 20 kDa regulatory light chain of myosin II (MLC20) Ser19 phosphorylation. We have demonstrated that both the reduction of cell proliferation and the extent of cell attachment are attenuated by MP activation, indicating that MP might be an useful target for therapy of pathologies associated with excessive macrophage differentiation.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad, N., Adhami, V. M., Gupta, S., Cheng, P., & Mukhtar, H. (2002). Role of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway in cancer chemopreventive effects of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Arch Biochem Biophys*, 398(1), 125-131. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2704>
- Ahmad, N., Feyes, D. K., Nieminen, A. L., Agarwal, R., & Mukhtar, H. (1997). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 89(24), 1881-1886. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.24.1881>
- Ahn, J. H., McAvoy, T., Rakhilin, S. V., Nishi, A., Greengard, P., & Nairn, A. C. (2007). Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(8), 2979-2984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611532104>
- Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M., & Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem*, 210(3), 1023-1035. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17508.x>
- Amano, M., Fukata, Y., & Kaibuchi, K. (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*, 261(1), 44-51. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5046>
- Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(9), 545-554. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>
- Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Villa-Moruzzi, E., & Margolis, R. L. (1998). Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, 141(5), 1207-1215. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.5.1207>
- Babu, P. V., & Liu, D. (2008). Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*, 15(18), 1840-1850. <https://doi.org/10.2174/092986708785132979>
- Barilli, A., Rotoli B. M., Visigalli R., Bussolati O., Gazzola G. C., Dall'Asta V. (2011). Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(2), 293-303. <https://doi.org/10.1189/jlb.0910510>
- Baskaran, R., & Velmurugan, B. K. (2018). Protein phosphatase 2A as therapeutic targets in various disease models. *Life Sci*, 210, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.063>
- Beullens, M., Stalmans, W., & Bollen, M. (1996). Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver. *Eur J Biochem*, 239(1), 183-189. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0183u.x>
- Bhattacharya, A., Ghosh, P., Prasad, R., Ghosh, A., Das, K., Roy, A., Sen, P. (2020). MAP Kinase driven actomyosin rearrangement is a crucial regulator of monocyte to macrophage differentiation. *Cell Signal*, 73, 109691. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109691>
- Bobryshev, Y. V., Ivanova, E. A., Chistiakov, D. A., Nikiforov, N. G., & Orekhov, A. N. (2016). Macrophages and their role in atherosclerosis: Pathophysiology and transcriptome analysis. *Biomed Res Int*, 2016, 9582430. <https://doi.org/10.1155/2016/9582430>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brautigan, D. L. (2013). Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *Febs j*, 280(2), 324-345. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08609.x>
- Britschgi, A., Simon, H. U., Tobler, A., Fey, M. F., & Tschan, M. P. (2010). Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells and supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br J Haematol*, 149(1), 55-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08040.x>
- Broustas, C. G., Grammatikakis, N., Eto, M., Dent, P., Brautigan, D. L., & Kasid, U. (2002). Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, 277(4), 3053-3059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106343200>
- Burgess, A. W., & Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, 56(6), 947-958.
- Butler, T., Paul, J., Europe-Finner, N., Smith, R., & Chan, E. C. (2013). Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304(6), C485-504. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00161.2012>
- Bátori, R., Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedűs, C., Bordán, Z., Erdődi, F. (2017). Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci Rep*, 7, 44698. <https://doi.org/10.1038/srep44698>
- Cao, J., Han, J., Xiao, H., Qiao, J., & Han, M. (2016). Effect of tea polyphenol compounds on anticancer drugs in terms of anti-tumor activity, toxicology, and pharmacokinetics. *Nutrients*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/nu8120762>
- Ceulemans, H., & Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev*, 84(1), 1-39. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2003>
- Chacko, S., Conti, M. A., & Adelstein, R. S. (1977). Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca²⁺ regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(1), 129-133. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.1.129>
- Chao, A., Zhang, X., Ma, D., Langlais, P., Luo, M., Mandarino, L. J., Yi, Z. (2012). Site-specific phosphorylation of protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A stimulated or suppressed by insulin. *J Proteomics*, 75(11), 3342-3350. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.043>
- Chen, J., Martin, B. L., & Brautigan, D. L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, 257(5074), 1261-1264. <https://doi.org/10.1126/science.1325671>
- Chisato Miyaura and Etsuko Abe and Takeo Kuribayashi and Hirofumi Tanaka and Kunio Konno and Yasuho Nishii and Tatsuo, S. (1981). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102(3), 937-943. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(81\)91628-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91628-4)
- Chiyoda, T., Sugiyama, N., Shimizu, T., Naoe, H., Kobayashi, Y., Ishizawa, J., Kuninaka, S. (2012). LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol*, 197(5), 625-641. <https://doi.org/10.1083/jcb.201110110>

- Cho, H. S., Suzuki, T., Dohmae, N., Hayami, S., Unoki, M., Yoshimatsu, M., Hamamoto, R. (2011). Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer Res*, 71(3), 655-660. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-2446>
- Cohen, P. (1990). The structure and regulation of protein phosphatases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 24, 230-235.
- Cohen, P. T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, 22(7), 245-251. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01060-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01060-8)
- Cohen, P. T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci*, 115(Pt 2), 241-256
- Croft, D. R., Crichton, D., Samuel, M. S., Lourenco, F. C., Munro, J., Wood, J., Olson, M. F. (2011). p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*, 21(4), 666-682. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.154>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5(1), e8668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- Dedinszki, D., Kiss, A., Márkász, L., Márton, A., Tóth, E., Székely, L., & Erdődi, F. (2015). Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Signal*, 27(2), 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.021>
- Dent, P., & Grant, S. (2001). Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin Cancer Res*, 7(4), 775-783
- DiGiacomo, V., & Meruelo, D. (2016). Looking into laminin receptor: critical discussion regarding the non-integrin 37/67-kDa laminin receptor/RPSA protein. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 91(2), 288-310. <https://doi.org/10.1111/brv.12170>
- Dirksen, W. P., Vladic, F., & Fisher, S. A. (2000). A myosin phosphatase targeting subunit isoform transition defines a smooth muscle developmental phenotypic switch. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(3), C589-600. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.3.C589>
- Donald, M. M., J. F. San Miguel, H. C. Freake., P. M. Green, H. Zola, D. Catovsky, J. M. Goldman (1983). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leukemia Research*, 7(1), 51-55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-2126\(83\)90057-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-2126(83)90057-7)
- Dreskin, S. C., Thomas, G. W., Dale, S. N., & Heasley, L. E. (2001). Isoforms of Jun Kinase Are Differentially Expressed and Activated in Human Monocyte/Macrophage (THP-1) Cells. *The Journal of Immunology*, 166(9), 5646. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5646>
- Dubois, T., Howell, S., Zemlickova, E., Learmonth, M., Cronshaw, A., & Aitken, A. (2003). Novel in vitro and in vivo phosphorylation sites on protein phosphatase 1 inhibitor CPI-17. *Biochem Biophys Res Commun*, 302(2), 186-192. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00130-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00130-x)

- Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P., & Barford, D. (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo j*, 16(8), 1876-1887. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1876>
- Eng, Q. Y., Thanikachalam, P. V., & Ramamurthy, S. (2018). Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases. *J Ethnopharmacol*, 210, 296-310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.035>
- Erdélyi, K., Kiss, A., Bakondi, E., Bai, P., Szabó, C., Gergely, P., Virag, L. (2005). Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol Pharmacol*, 68(3), 895-904. <https://doi.org/10.1124/mol.105.012518>
- Erdodi, F., Toth. B., Hirano K., Hirano M., Hartshorne D. J., Gergely P. (1995). Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 269(5), C1176-C1184. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1176> , note = PMID: 7491907
- Erdödi, F., Csontos, C., Sparks, L., Murányi, A., & Gergely, P. (1992). Purification and characterization of three distinct types of protein phosphatase catalytic subunits in bovine platelets. *Arch Biochem Biophys*, 298(2), 682-687. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90466-](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90466-)
- Eto, M. (2009). Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem*, 284(51), 35273-35277. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.059972>
- Eto, M., & Brautigan, D. L. (2012). Endogenous inhibitor proteins that connect Ser/Thr kinases and phosphatases in cell signaling. *IUBMB Life*, 64(9), 732-739. <https://doi.org/10.1002/iub.1067>
- Eto, M., Karginov, A., & Brautigan, D. L. (1999). A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry*, 38(51), 16952-16957. <https://doi.org/10.1021/bi992030o>
- Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K., & Morita, F. (1995). A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem*, 118(6), 1104-1107. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124993>
- Eto, M., Senba, S., Morita, F., & Yazawa, M. (1997). Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett*, 410(2-3), 356-360. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00657-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00657-1)
- Fardilha, M., Esteves, S. L., Korrodi-Gregório, L., da Cruz e Silva, O. A., & da Cruz e Silva, F. F. (2010). The physiological relevance of protein phosphatase 1 and its interacting proteins to health and disease. *Curr Med Chem*, 17(33), 3996-4017. <https://doi.org/10.2174/092986710793205363>
- Favre, B., Turowski, P., & Hemmings, B. A. (1997). Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem*, 272(21), 13856-13863. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13856>
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D. J., & Nakano, T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274(52), 37385-37390. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37385>

- Fernández, J. J., Candenás, M. L., Souto, M. L., Trujillo, M. M., & Norte, M. (2002). Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*, 9(2), 229-262. <https://doi.org/10.2174/0929867023371247>
- Fukata, Y., Kimura, K., Oshiro, N., Saya, H., Matsuura, Y., & Kaibuchi, K. (1998). Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol*, 141(2), 409-418. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.409>
- Gergely, P., Erdödi, F., & Bot, G. (1984). Heparin inhibits the activity of protein phosphatase-1. *FEBS Lett*, 169(1), 45-48. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80286-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80286-0)
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57(7), 727-741. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00307-4)
- Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C., & Kuriyan, J. (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, 376(6543), 745-753. <https://doi.org/10.1038/376745a0>
- Gong, J. P., Liu, Q. R., Zhang, P. W., Wang, Y., & Uhl, G. R. (2005). Mouse brain localization of the protein kinase C-enhanced phosphatase 1 inhibitor KEPI (kinase C-enhanced PP1 inhibitor). *Neuroscience*, 132(3), 713-727. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.052>
- Goyal, P., Pandey, D., Behring, A., & Siess, W. (2005). Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J Biol Chem*, 280(30), 27569-27577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504448200>
- Goyal, P., Pandey, D., & Siess, W. (2006). Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 281(35), 25223-25230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603399200>
- Grassie, M. E., Moffat, L. D., Walsh, M. P., & MacDonald, J. A. (2011). The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1δ. *Arch Biochem Biophys*, 510(2), 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.018>
- Grassie, M. E., Sutherland, C., Ulke-Lemée, A., Chappellaz, M., Kiss, E., Walsh, M. P., & MacDonald, J. A. (2012). Cross-talk between Rho-associated kinase and cyclic nucleotide-dependent kinase signaling pathways in the regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 287(43), 36356-36369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398479>
- Grey, J., Jones, D., Wilson, L., Nakjang, S., Clayton, J., Temperley, R., Robson, C. (2018). Differential regulation of the androgen receptor by protein phosphatase regulatory subunits. *Oncotarget*, 9(3), 3922-3935. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22883>
- Han, Y. (2019). Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med*, 17(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1869-4>
- Hartshorne, D. J., Ito, M., & Erdödi, F. (2004). Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 279(36), 37211-37214. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400018200>
- Hayashi, Y., Senba, S., Yazawa, M., Brautigan, D. L., & Eto, M. (2001). Defining the structural determinants and a potential mechanism for inhibition of myosin phosphatase by the protein kinase

C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa. *J Biol Chem*, 276(43), 39858-39863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107302200>

Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1. *J Biol Chem*, 259(23), 14491-14497.

Henry, D., Brumaire, S., & Hu, X. (2019). Involvement of pRb-E2F pathway in green tea extract-induced growth inhibition of human myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 77, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.12.014>

Heroes, E., Lesage, B., Görmann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., & Bollen, M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *Febs j*, 280(2), 584-595. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x>

Horváth, D., Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., Bátori, R., Dedinszki, D., Lontay, B. (2018). Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(10), 3268-3280. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.013>

Hsu, F. F., Lin, T. Y., Chen, J. Y., & Shieh, S. Y. (2010). p53-Mediated transactivation of LIMK2b links actin dynamics to cell cycle checkpoint control. *Oncogene*, 29(19), 2864-2876. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.40>

Hu, X., Li, Z., Ding, Y., Geng, Q., Xiahou, Z., Ru, H., Li, J. (2018). Chk1 modulates the interaction between myosin phosphatase targeting protein 1 (MYPT1) and protein phosphatase 1c β (PP1c β). *Cell Cycle*, 17(4), 421-427. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1418235>

Huang, F. L., & Glinsmann, W. H. (1976). Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, 70(2), 419-426. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb11032.x>

Huang, J., Mahavadi, S., Sriwai, W., Hu, W., & Murthy, K. S. (2006). Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway. *Biochem J*, 396(1), 193-200. <https://doi.org/10.1042/bj20051772>

Hubbard, M. J., & Cohen, P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, 18(5), 172-177. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90109-z](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90109-z)

Ichikawa, K., Hirano, K., Ito, M., Tanaka, J., Nakano, T., & Hartshorne, D. J. (1996). Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry*, 35(20), 6313-6320. <https://doi.org/10.1021/bi960208q>

Ikebe, M., & Hartshorne, D. J. (1985). The role of myosin phosphorylation in the contraction-relaxation cycle of smooth muscle. *Experientia*, 41(8), 1006-1010. <https://doi.org/10.1007/bf01952122>

Ingebritsen, T. S., & Cohen, P. (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem*, 132(2), 255-261. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07357.x>

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*, 5, 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>

- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., & Hartshorne, D. J. (2004). Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, 259(1-2), 197-209. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000021373.14288.00>
- Izawa, T., Fukata, Y., Kimura, T., Iwamatsu, A., Dohi, K., & Kaibuchi, K. (2000). Elongation factor-1 alpha is a novel substrate of rho-associated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(1), 72-78. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3772>
- Jagiello, I., Beullens, M., Vulsteke, V., Wera, S., Sohlberg, B., Stalmans, W., Bollen, M. (1997). NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *J Biol Chem*, 272(35), 22067-22071. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22067>
- Janssens, V., & Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 353(Pt 3), 417-439. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530417>
- Janssens, V., Longin, S., & Goris, J. (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci*, 33(3), 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.004>
- Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P., & Morrison, H. (2006). Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature*, 442(7102), 576-579. <https://doi.org/10.1038/nature04856>
- Johnson, D., Cohen, P., Chen, M. X., Chen, Y. H., & Cohen, P. T. (1997). Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem*, 244(3), 931-939. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00931.x>
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 4), 627-641. <https://doi.org/10.1042/bst0370627>
- Kamibayashi, C., Estes, R., Lickteig, R. L., Yang, S. I., Craft, C., & Mumby, M. C. (1994). Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J Biol Chem*, 269(31), 20139-20148.
- Karlmark, K. R., Tacke, F., & Dunay, I. R. (2012). Monocytes in health and disease - Minireview. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2(2), 97-102. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.2.2012.2.1>
- Kataoka, N., Iwaki, K., Hashimoto, K., Mochizuki, S., Ogasawara, Y., Sato, M., Kajiya, F. (2002). Measurements of endothelial cell-to-cell and cell-to-substrate gaps and micromechanical properties of endothelial cells during monocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15638-15643. <https://doi.org/10.1073/pnas.242590799>
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 66(5), 2500-2505. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-3636>
- Khromov, A., Choudhury, N., Stevenson, A. S., Somlyo, A. V., & Eto, M. (2009). Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*, 284(32), 21569-21579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019729>
- Kiang, K. M., & Leung, G. K. (2018). A Review on Adducin from Functional to Pathological Mechanisms: Future Direction in Cancer. *Biomed Res Int*, 2018, 3465929. <https://doi.org/10.1155/2018/3465929>

- Kim, K. M., Csontos, C., Czikora, I., Fulton, D., Umapathy, N. S., Olah, G., & Verin, A. D. (2012). Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium. *J Cell Physiol*, 227(4), 1701-1708. <https://doi.org/10.1002/jcp.22894>
- Kim, W. K., Jung, H., Kim, D. H., Kim, E. Y., Chung, J. W., Cho, Y. S., Lee, S. C. (2009). Regulation of adipogenic differentiation by LAR tyrosine phosphatase in human mesenchymal stem cells and 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci*, 122(Pt 22), 4160-4167. <https://doi.org/10.1242/jcs.053009>
- Kimura, K., Fukata, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y., Okawa, K., Kaibuchi, K. (1998). Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 273(10), 5542-5548. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5542>
- Kirchhefer, U., Heinick, A., König, S., Kristensen, T., Müller, F. U., Seidl, M. D., & Boknik, P. (2014). Protein phosphatase 2A is regulated by protein kinase C α (PKC α)-dependent phosphorylation of its targeting subunit B56 α at Ser41. *J Biol Chem*, 289(1), 163-176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507996>
- Kiss, A., Bécsi, B., Kolozsvári, B., Komáromi, I., Kövér, K. E., & Erdődi, F. (2013). Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl- β -D-glucose inhibit protein phosphatase-1. *Febs j*, 280(2), 612-626. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08498.x>
- Kiss, A., Erdődi, F., & Lontay, B. (2019). Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(1), 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.023>
- Kiss, A., Lontay, B., Bécsi, B., Márkász, L., Oláh, E., Gergely, P., & Erdodi, F. (2008). Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal*, 20(11), 2059-2070. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.07.018>
- Kiss, E., Murányi, A., Csontos, C., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., & Erdodi, F. (2002). Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J*, 365(Pt 1), 79-87. <https://doi.org/10.1042/bj20011295>
- Kitazawa, T., Eto, M., Woodsome, T. P., & Brautigan, D. L. (2000). Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem*, 275(14), 9897-9900. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9897>
- Kolozsvári, B., Bakó, É., Bécsi, B., Kiss, A., Czikora, Á., Tóth, A., Erdődi, F. (2012). Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase. *Cardiovasc Res*, 96(3), 494-503. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs255>
- Kolupaeva, V., & Janssens, V. (2013). PP1 and PP2A phosphatases--cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *Febs j*, 280(2), 627-643. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08511.x>
- Kornblau, S. M., Andreeff, M., Hu, S. X., Xu, H. J., Patel, S., Theriault, A., Benedict, W. F. (1998). Low and maximally phosphorylated levels of the retinoblastoma protein confer poor prognosis in newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a prospective study. *Clin Cancer Res*, 4(8), 1955-1963.

- Kovacs-Kasa, A., Gorshkov, B. A., Kim, K. M., Kumar, S., Black, S. M., Fulton, D. J., Verin, A. D. (2016). The protective role of MLCP-mediated ERM dephosphorylation in endotoxin-induced lung injury in vitro and in vivo. *Sci Rep*, 6, 39018. <https://doi.org/10.1038/srep39018>
- Kremmer, E., Ohst, K., Kiefer, J., Brewis, N., & Walter, G. (1997). Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol*, 17(3), 1692-1701. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1692>
- Kumazoe, M., Kim, Y., Bae, J., Takai, M., Murata, M., Suemasu, Y., Tachibana, H. (2013). Phosphodiesterase 5 inhibitor acts as a potent agent sensitizing acute myeloid leukemia cells to 67-kDa laminin receptor-dependent apoptosis. *FEBS Lett*, 587(18), 3052-3057. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.041>
- Kónya, Z., Bécsi, B., Kiss, A., Horváth, D., Raics, M., Kövér, K. E., Erdődi, F. (2019). Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A by ellagitannins: structure-inhibitory potency relationships and influences on cellular systems. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 34(1), 500-509. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1557653>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Ley, K., Miller, Y. I., & Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(7), 1506-1516. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.221127>
- Liberto, M., & Cobrinik, D. (2000). Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate. *Cancer Lett*, 154(2), 151-161. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(00\)00378-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(00)00378-5)
- Liu, C. W., Wang, R. H., & Berndt, N. (2006). Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation. *Mol Carcinog*, 45(9), 648-656. <https://doi.org/10.1002/mc.20191>
- Liu, Q. R., Zhang, P. W., Lin, Z., Li, Q. F., Woods, A. S., Troncoso, J., & Uhl, G. R. (2004). GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA. *Biochem J*, 377(Pt 1), 171-181. <https://doi.org/10.1042/bj20030128>
- Liu, Q. R., Zhang, P. W., Zhen, Q., Walther, D., Wang, X. B., & Uhl, G. R. (2002). KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J Biol Chem*, 277(15), 13312-13320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107558200>
- Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., Kőszeghy, Á., Szűcs, G., Rusznák, Z., & Erdődi, F. (2012). Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J Neurochem*, 123(1), 84-99. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x>
- Lontay, B., Serfozo, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., & Erdodi, F. (2004). Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol*, 478(1), 72-87. <https://doi.org/10.1002/cne.20273>
- MacDonald, J. A., Borman, M. A., Murányi, A., Somlyo, A. V., Hartshorne, D. J., & Haystead, T. A. (2001). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2419-2424. <https://doi.org/10.1073/pnas.041331498>
- MacKintosh, C., & MacKintosh, R. W. (1994). Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem Sci*, 19(11), 444-448. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90127-9)

- Manetti, F. (2012). Recent findings confirm LIM domain kinases as emerging target candidates for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(5), 543-560. <https://doi.org/10.2174/156800912800673266>
- Martelli, A. M., Evangelisti, C., Chappell, W., Abrams, S. L., Bäsecke, J., Stivala, F., McCubrey, J. A. (2011). Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia*, 25(7), 1064-1079. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.46>
- Matsumura, F., & Hartshorne, D. J. (2008). Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(1), 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.090>
- Mazhar, S., Taylor, S. E., Sangodkar, J., & Narla, G. (2019). Targeting PP2A in cancer: Combination therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.08.020>
- Meeusen, B., & Janssens, V. (2018). Tumor suppressive protein phosphatases in human cancer: Emerging targets for therapeutic intervention and tumor stratification. *Int J Biochem Cell Biol*, 96, 98-134. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.10.002>
- Montuori, N., Selleri, C., Risitano, A. M., Raiola, A. M., Ragno, P., Del Vecchio, L., Rossi, G. (1999). Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res*, 5(6), 1465-1472.
- Moorhead, G., Johnson, D., Morrice, N., & Cohen, P. (1998). The major myosin phosphatase in skeletal muscle is a complex between the beta-isoform of protein phosphatase 1 and the MYPT2 gene product. *FEBS Lett*, 438(3), 141-144. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01276-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01276-9)
- Murao, S., Gemmell, M., Callahan M., Anderson N., Huberman E. (1983). Control of Macrophage Cell Differentiation in Human Promyelocytic HL-60 Leukemia Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer research*, 43, 4989-4996.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 723-737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Murányi, A., MacDonald, J. A., Deng, J. T., Wilson, D. P., Haystead, T. A., Walsh, M. P., Hartshorne, D. J. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J*, 366(Pt 1), 211-216. <https://doi.org/10.1042/bj20020401>
- Murányi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H. F., & Hartshorne, D. J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett*, 493(2-3), 80-84. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02283-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02283-9)
- Ménard, S., Castronovo, V., Tagliabue, E., & Sobel, M. E. (1997). New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J Cell Biochem*, 67(2), 155-165. Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cell Signal*, 11(9), 671-676. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(99)00036-4)
- Narla, G., Sangodkar, J., & Ryder, C. B. (2018). The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer. *Cell Mol Life Sci*, 75(15), 2695-2718. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2826-8>

- Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2018). Molecular Targets of Epigallocatechin-Gallate (EGCG): A Special Focus on Signal Transduction and Cancer. *Nutrients*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/nu10121936>
- Niir, N., & Ikebe, M. (2001). Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 276(31), 29567-29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102753200>
- Nishikawa, M., Omay, S. B., Nakai, K., Kihira, H., Kobayashi, T., Tamura, S., & Shiku, H. (1995). Up-regulation of protein serine/threonine phosphatase type 2C during 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of leukemic HL-60 cells. *FEBS Lett*, 375(3), 299-303. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01209-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01209-w)
- Nomoto, S., Tatematsu, Y., Takahashi, T., & Osada, H. (1999). Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene*, 236(2), 259-271. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00280-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00280-2)
- O'Brien, J., Wilson I., Orton T., Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421-5426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- O'Donohue, M. F., Choesmel, V., Faublader, M., Fichant, G., & Gleizes, P. E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *J Cell Biol*, 190(5), 853-866. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005117>
- Okamura, H., Yoshida, K., Morimoto, H., Teramachi, J., Ochiai, K., Haneji, T., & Yamamoto, A. (2017). Role of Protein Phosphatase 2A in Osteoblast Differentiation and Function. *J Clin Med*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/jcm6030023>
- Oliver, C. J., & Shenolikar, S. (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci*, 3, D961-972. <https://doi.org/10.2741/a336>
- Omay, S. B., Nakai, K., Kuno, T., Shiku, H., & Nishikawa, M. (1996). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced upregulation of calcineurin during leukemic HL-60 cell differentiation. *Blood*, 87(7), 2947-2955.
- Omay, S. B., Ogasawara, H., Toyoda, H., Nakai, K., Shima, H., Nagao, M., Nishikawa, M. (1995). Translocation of protein phosphatase 1 catalytic subunits during 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res*, 55(4), 774-780.
- Osada, H., Hasada, K., Inazawa, J., Uchida, K., Ueda, R., & Takahashi, T. (1996). Subcellular localization and protein interaction of the human LIMK2 gene expressing alternative transcripts with tissue-specific regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 229(2), 582-589. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1847>
- Parra, M., Mahmoudi, T., & Verdin, E. (2007). Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev*, 21(6), 638-643. <https://doi.org/10.1101/gad.1513107>
- Peti, W., Nairn, A. C., & Page, R. (2013). Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *Febs j*, 280(2), 596-611. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x>
- Prunier, C., Prudent, R., Kapur, R., Sadoul, K., & Lafanechère, L. (2017). LIM kinases: cofilin and beyond. *Oncotarget*, 8(25), 41749-41763. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16978>

- Qin, J., Chen, H. G., Yan, Q., Deng, M., Liu, J., Doerge, S., Li, D. W. (2008). Protein phosphatase-2A is a target of epigallocatechin-3-gallate and modulates p53-Bak apoptotic pathway. *Cancer Res*, 68(11), 4150-4162. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0839>
- Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H., & Miner, A. S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(4), C769-783. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00529.2004>
- Riecken, L. B., Zoch, A., Wiehl, U., Reichert, S., Scholl, I., Cui, Y., Morrison, H. (2016). CPI-17 drives oncogenic Ras signaling in human melanomas via Ezrin-Radixin-Moesin family proteins. *Oncotarget*, 7(48), 78242-78254. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12919>
- Rubin, E., Mitnacht, S., Villa-Moruzzi, E., & Ludlow, J. W. (2001). Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene*, 20(29), 3776-3785. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204518>
- Ruvolo, P. P., Deng, X., & May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4), 515-522. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402090>
- Samson, S. C., Elliott, A., Mueller, B. D., Kim, Y., Carney, K. R., Bergman, J. P., Mendoza, M. C. (2019). p90 ribosomal S6 kinase (RSK) phosphorylates myosin phosphatase and thereby controls edge dynamics during cell migration. *J Biol Chem*, 294(28), 10846-10862. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007431>
- Schaaf, K., Smith, S. R., Duverger, A., Wagner, F., Wolschendorf, F., Westfall, A. O., Sun, J. (2017). Mycobacterium tuberculosis exploits the PPM1A signaling pathway to block host macrophage apoptosis. *Sci Rep*, 7, 42101. <https://doi.org/10.1038/srep42101>
- Schwende, H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(4), 555-561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlb.59.4.555>
- Scott, R. W., & Olson, M. F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med (Berl)*, 85(6), 555-568. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0165-6>
- Sefton, B. M. (2001). Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 14, Unit 14.11. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1401s00>
- Serrano, I., McDonald, P. C., Lock, F., Muller, W. J., & Dedhar, S. (2013). Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat Commun*, 4, 2976. <https://doi.org/10.1038/ncomms3976>
- Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139(3), 468-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>
- Sipos, A., Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., Tamás, I., Horváth, D., Lontay, B. (2017). Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep*, 7, 40590. <https://doi.org/10.1038/srep40590>
- Skalhegg, B. S., & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 5, D678-693. <https://doi.org/10.2741/skalhegg>
- Slupe, A. M., Merrill, R. A., & Strack, S. (2011). Determinants for substrate specificity of protein phosphatase 2A. *Enzyme Res*, 2011, 398751. <https://doi.org/10.4061/2011/398751>

- Smith, S. R., Schaaf, K., Rajabalee, N., Wagner, F., Duverger, A., Kutsch, O., & Sun, J. (2018). The phosphatase PPM1A controls monocyte-to-macrophage differentiation. *Sci Rep*, 8(1), 902. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18832-7>
- Steven, B. S., Richard K. F., Hyo-Jeong K., J. Marshall C. (2007). Mutation of threonine 422 to glutamic acid mimics the phosphorylation state and alters the action of deltamethrin on Cav2.2. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.01.007>
- Sumi, T., Matsumoto, K., & Nakamura, T. (2001). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 276(1), 670-676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007074200>
- Sun, J., Schaaf, K., Duverger, A., Wolschendorf, F., Speer, A., Wagner, F., Kutsch, O. (2016). Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1A controls the innate antiviral and antibacterial response of macrophages during HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis infection. *Oncotarget*, 7(13), 15394-15409. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8190>
- Sutherland, C., & Walsh, M. P. (2012). Myosin regulatory light chain diphosphorylation slows relaxation of arterial smooth muscle. *J Biol Chem*, 287(29), 24064-24076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371609>
- Suyama, E., Wadhwa, R., Kawasaki, H., Yaguchi, T., Kaul, S. C., Nakajima, M., & Taira, K. (2004). LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy. *J Gene Med*, 6(3), 357-363. <https://doi.org/10.1002/jgm.491>
- Sánchez-Martín, L., Estecha, A., Samaniego, R., Sánchez-Ramón, S., Vega, M., & Sánchez-Mateos, P. (2011). The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood*, 117(1), 88-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258186>
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*, 11(4), 380-381. <https://doi.org/10.1038/nsmb743>
- Takahashi, N., Ito, M., Tanaka, J., Nakano, T., Kaibuchi, K., Odai, H., & Takemura, K. (1997). Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21. *Genomics*, 44(1), 150-152. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4859>
- Takizawa, N., Koga, Y., & Ikebe, M. (2002). Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 297(4), 773-778. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02302-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02302-1)
- Tamura, M., Nakao, H., Yoshizaki, H., Shiratsuchi, M., Shigyo, H., Yamada, H., Hidaka, H. (2005). Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.015>
- Tang, P. M., Bondor, J. A., Swiderek, K. M., & DePaoli-Roach, A. A. (1991). Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *J Biol Chem*, 266(24), 15782-15789.
- Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., & Dominguez, R. (2004). Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, 429(6993), 780-784. <https://doi.org/10.1038/nature02582>
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Dixit, V. M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves

the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 81(5), 801-809. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90541-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90541-3)

Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hosoya, H., Hartshorne, D. J., & Matsumura, F. (1999). Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol*, 144(4), 735-744. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.735>

Traore, K., Trush, M. A., George, M., Jr., Spannhake, E. W., Anderson, W., & Asseffa, A. (2005). Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res*, 29(8), 863-879. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.12.011>

Tsai, C. S., Lin, Y. W., Huang, C. Y., Shih, C. M., Tsai, Y. T., Tsao, N. W., Lin, F. Y. (2016). Thrombomodulin regulates monocyte differentiation via PKC δ and ERK1/2 pathway in vitro and in atherosclerotic artery. *Sci Rep*, 6, 38421. <https://doi.org/10.1038/srep38421>

Tsukamoto, S., Huang, Y., Umeda, D., Yamada, S., Yamashita, S., Kumazoe, M., Tachibana, H. (2014). 67-kDa laminin receptor-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance. *J Biol Chem*, 289(47), 32671-32681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.604983>

Tóth, A., Kiss, E., Gergely, P., Walsh, M. P., Hartshorne, D. J., & Erdödi, F. (2000). Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Lett*, 484(2), 113-117. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02138-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02138-4)

Tóth, A., Kiss, E., Herberg, F. W., Gergely, P., Hartshorne, D. J., & Erdödi, F. (2000). Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem*, 267(6), 1687-1697. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01158.x>

Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008). Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 371(1), 172-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.041>

Ushach, I., & Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*, 100(3), 481-489. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R>

Vallée, B., Cuberos, H., Doudeau, M., Godin, F., Gosset, D., Vourc'h, P., Bénédicti, H. (2018). LIMK2-1, a new isoform of human LIMK2, regulates actin cytoskeleton remodeling via a different signaling pathway than that of its two homologs, LIMK2a and LIMK2b. *Biochem J*, 475(23), 3745-3761. <https://doi.org/10.1042/bcj20170961>

Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S., & Cohen, P. (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett*, 527(1-3), 101-104. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03175-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03175-7)

Venticinque, L., & Meruelo, D. (2012). Comprehensive proteomic analysis of nonintegrin laminin receptor interacting proteins. *J Proteome Res*, 11(10), 4863-4872. <https://doi.org/10.1021/pr300307h>

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3), 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

- Virshup, D. M., & Shenolikar, S. (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell*, 33(5), 537-545. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>
- Vlecken, D. H., & Bagowski, C. P. (2009). LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Zebrafish*, 6(4), 433-439. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0602>
- Wang, Q. M., Wang, H., Li, Y. F., Xie, Z. Y., Ma, Y., Yan, J. J., Wang, L. S. (2016). Inhibition of EMMPRIN and MMP-9 Expression by Epigallocatechin-3-Gallate through 67-kDa Laminin Receptor in PMA-Induced Macrophages. *Cell Physiol Biochem*, 39(6), 2308-2319. <https://doi.org/10.1159/000447923>
- Wang, R. H., Liu, C. W., Avramis, V. I., & Berndt, N. (2001). Protein phosphatase 1 α -mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, 20(43), 6111-6122. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204829>
- Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., & Haystead, T. A. (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 279(33), 34496-34504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405957200>
- Wu, R., Yang, H., Wan, J., Deng, X., Chen, L., Hao, S., & Ma, L. (2018). Knockdown of the Hippo transducer YAP reduces proliferation and promotes apoptosis in the Jurkat leukemia cell. *Mol Med Rep*, 18(6), 5379-5388. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9556>
- Wu, S. E., & Miller, W. E. (2015). The human cytomegalovirus lytic cycle is induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in peripheral blood monocytes and in the THP-1 monocytic cell line. *Virology*, 483, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.04.004>
- Wu, X., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1996). Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 220(3), 658-663. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0460>
- Wu, Y., Murányi, A., Erdodi, F., & Hartshorne, D. J. (2005). Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants. *J Muscle Res Cell Motil*, 26(2-3), 123-134. <https://doi.org/10.1007/s10974-005-2579-5>
- Xia, D., Stull, J. T., & Kamm, K. E. (2005). Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. *Exp Cell Res*, 304(2), 506-517. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.11.025>
- Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*, 127(6), 1239-1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.033>
- Yamamoto, M., Suzuki, Y., Kihira, H., Miwa, H., Kita, K., Nagao, M., Nishikawa, M. (1999). Expressions of four major protein Ser/Thr phosphatases in human primary leukemic cells. *Leukemia*, 13(4), 595-600. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401372>
- Yan, Y., & Mumby, M. C. (1999). Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, 274(45), 31917-31924. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31917>
- Yang, L., Dai, F., Tang, L., Le, Y., & Yao, W. (2017). Macrophage differentiation induced by PMA is mediated by activation of RhoA/ROCK signaling. *J Toxicol Sci*, 42(6), 763-771. <https://doi.org/10.2131/jts.42.763>

TÁRGYSZAVAK

Lim kináz-2 (LIMK2)

Miozin foszfatáz (MP)

Epigallokatechin-3-gallát (EGCG)

Daunorubicin (DNR)

Retinoblasztóma fehérje

THP-1 humán akut leukémia monocita sejtek

Makrofág differenciáció

Lim kinase 2 (LIMK2)

Myosin phosphatase (MP)

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

Daunorubicin (DNR)

Retinoblastoma protein (pRb)

THP-1 leukemic cells

Macrophage differentiation

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kiss Andreának, aki az itt eltöltött éveim alatt mindvégig lelkiismeretesen segítette és támogatta munkámat, továbbá köszönöm az *in vitro* foszfatázaktivitás mérések kivitelezésében nyújtott segítségét. Köszönöm Dr. Erdődi Ferenc egyetemi tanárnak, aki hasznos tanácsaival, ötleteivel számtalanszor egyengette utamat. Köszönettel tartozom Dr. Virág László intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette kísérleteim elvégzését a DE-ÁOK Orvosi Vegytani Intézetben. Köszönöm továbbá az Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor bátran fordulhattam hozzájuk segítségért. Hálás vagyok munkacsoportunk minden volt és jelenlegi tagjának (Dr. Lontay Beáta, Dr. Bécsi Bálint, Dr. Bátori Róbert, Dr. Nagy Dénes, Dr. Dedinszki Dóra, Dr. Horváth Dániel) a munkám során nyújtott segítségéért és türelméért. Köszönöm Tamás Istvánnak és Dr. Kónya Zoltánnak, hogy mindenben számíthattam rájuk és hogy mindig vidámságot hoztak a mindennapokba. Külön köszönöm Dr. Sipos Adriennek és Major Evelinnek az évek során nyújtott felbecsülhetetlen értékű szakmai- és lelki segítségnyújtást, barátságukat. Köszönettel tartozom Kelemenné Szántó Ágotának, Docsa Andreának valamint Dr. Németh Árpádnak nemcsak a kísérletek során nyújtott asszisztenciájukért, de kedvességükért, bátorításukért egyaránt. A mutáns plazmidok szekvenálásáért köszönettel tartozom továbbá Dr. Póliska Szilárdnak. Hálásan köszönöm szüleimnek és barátaimnak, akiknek szeretetüket, türelmüket és bátorításukat mindvégig magaménak tudhattam, illetve Attilának, aki a legnehezebb időszakokban is mindig kitartott mellettem.

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/505/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Emese

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, E.**, Erdődi, F., Kiss, A.: Activation of Myosin Phosphatase by Epigallocatechin-Gallate Sensitizes THP-1 Leukemic Cells to Daunorubicin.
ACAMC. 21 (9), 1092-1098, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1871520620666200717142315>
IF: 2.507 (2020)
2. **Tóth, E.**, Erdődi, F., Kiss, A.: Myosin Phosphatase Is Implicated in the Control of THP-1 Monocyte to Macrophage Differentiation.
Int. J. Mol. Sci. 22 (5), 1-13, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22052516>
IF: 5.923 (2020)





További közlemények

3. Nagy, S., **Tóth, E.**, Kacsir, I., Makai, A., Bényei, A., Buglyó, P.: Effect of the replacement of tripodal 4N donors by two 2N chelators on the redox and cytotoxic activity of maltolato and deferipronato containing Co(III) complexes.
J. Inorg. Biochem. 220, 1-10, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111372>
IF: 4.155 (2020)
4. Dedinszki, D., Kiss, A., Márkász, L., Márton, A., **Tóth, E.**, Székely, L., Erdődi, F.: Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs.
Cell. Signal. 27, 363-372, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.021>
IF: 4.191

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,776

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,43**

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

Debrecen, 2021.11.24.



Előadások és poszterek az értekezés témájában

Konferenciaelőadások:

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: Expression and phosphorylation of CPI-17- like proteins in tumor cell lines. Signaling pathways in cancer biology, Training course, Mátraháza, 2014

Tóth Emese, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc: A LIMK-kináz 2 azonosítása új PP1 inhibitor fehérjeként. 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2015

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: LIM-kinase 2, as a novel CPI-17-like protein phosphatase-1 inhibitor. Cell Biology and Signaling Conference, Training course, Egerszalók, 2015

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: A new function of LIM kinase-2, as a protein phosphatase-1 inhibitory protein. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, 2015

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: Regulation of PP1 by inhibitory proteins and nucleocytoplasmic trafficking of MYPT1. Cell Biology and Signaling Conference, Training course, Galyatető, 2016

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Newly identified functions of LIM kinase-2, as a CPI-17-like protein phosphatase-1 inhibitory protein. Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, 2016

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Phosphorylation of Ser20 residue might be involved in the regulation of nucleocytoplasmic trafficking of myosin phosphatase target subunit 1. Cell Biology and Signaling Conference, Training course, Mátraháza, 2017

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Role of MP activation in chemosensitivity and differentiation of leukemic cells. Cell Biology and Signaling Conference, Training course, Tiszafüred, 2018

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Activation of myosin phosphatase increases the chemosensitivity of cancer cells. Cell Biology and Signaling Conference, Training course, Visegrád, 2019

Konferencia poszterek:

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: Identification of LIM kinase 2 as a novel PP1 inhibitor in THP-1 leukemic cells. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, 2014

Tóth Emese, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc: A LIMK-kináz 2 azonosítása új PP1 inhibitor fehérjeként. 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2015

Emese Tóth, Andrea Kiss, Ferenc Erdődi: LIM-kinase-2: a newly identified protein phosphatase-1 inhibitory protein. Europhosphatase 2015: Phosphorylation switches and cellular homeostasis, Turku, Finland, 2015

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Newly identified PP1 inhibitory functions of LIM kinase-2. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, 2016

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: LIM kinase 2 is a novel inhibitor of PP1c. Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions. Paris, France, 2017

Andrea Kiss, **Emese Tóth**, Ferenc Erdődi: Phosphorylation of Ser20 residue might be involved in the regulation of nucleocytoplasmic trafficking of myosin phosphatase target subunit 1. Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions. Paris, France, 2017

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Role of myosin phosphatase in chemosensitivity of leukemic cells. FEBS3+ conference 'From molecules to living systems. Siófok, 2018

Emese Tóth, Ferenc Erdődi, Andrea Kiss: Activation of myosin phosphatase sensitizes cancer cells to chemotherapeutic drugs. Europhosphatase 2019: From molecular mechanism to system-wide responses. Debrecen, 2019