

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Tóth Emese

Témavezető: Dr. Kiss Andrea



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

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

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

Írta: Tóth Emese okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Dr. Kiss Andrea

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Dr. Apáti Ágota, PhD
	Dr. Csősz Éva, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2022. április 11. 10:15

Az értekezés bírálói:

Dr. Vas Virág, PhD
Dr. Mádi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Dr. Apáti Ágota, PhD
	Dr. Csősz Éva, az MTA doktora
	Dr. Vas Virág, PhD
	Dr. Mádi András, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2022. április 11. 13:30

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a toth.emese@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2022. április 08.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

BEVEZETÉS

A kinázok és foszfatázok által katalizált fehérje foszforiláció és defoszforiláció az élettani folyamatok szabályozásának fontos mechanizmusa. 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. Az eukarióta sejtekben a szerin/treonin (Ser/Thr) specifikus foszfatázok fordulnak elő legnagyobb számban, melyek közül a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek kiemelt jelentőséggel bírnak.

A PP1 és PP2A szerkezete és szabályozása

A PP1 valamennyi eukarióta sejttypusban expresszálódik és részt vesz többek között a sejtosztódás, fehérjeszintézis, citoskeleton szerveződés vagy az apoptózis szabályozásában. A PP1 típusú enzimek egy 36-38 kDa méretű katalitikus alegységből (PP1c) és számos különböző szabályozó alegység egyikéből épülnek fel. A katalitikus alegységek önmagukban is képesek a szubsztrátmolekulák defoszforilációjára, ám szubsztrátspecifitásuk szabad formában meglehetősen széles. Azonban a PP1c a sejtekben különböző szabályozó alegységekkel holoenzimet alkotva fordul elő, melyek az enzim szubsztrátspecifitását és katalitikus aktivitását egyaránt befolyásolhatják.

A PP2A enzimeknek kitüntetett szerepük van a sejtproliferáció, apoptózis, sejtmotilitás, valamint a sejtciklus szabályozásában egyaránt. A PP1 enzimsaládhoz hasonlóan a katalitikus alegység számos regulátor alegységgel kölcsönhatásba lépve alkothat holoenzimet. Az enzim szerkezetét tekintve heterotrimerként funkcionál: egy 36 kDa méretű katalitikus C alegységből (PP2Ac), egy 65 kDa méretű A regulátor alegységből (PR65), valamint egy ehhez kapcsolódó, változatos szerkezetű B alegység egyikéből épül fel. A disszociálható B alegységek négy csoportba sorolhatók: ide tartoznak a B (B55 vagy PR55), B' (B56 vagy PR61), B'' (PR48/PR72/PR130) és a B''' (PR93/PR110) fehérjecsaldók, mely alegységek mindegyikének 2-5 izoformája ismert.

A PP1 és PP2A gátlására a természetben számos, mikroorganizmusok által termelt membránpermeabilis toxin fordul elő, melyek koncentráció-függő

szelektív gátló hatásuknak köszönhetően elengedhetetlenül fontosak az egyes foszfatázok szerepének vizsgálatában. Ilyen toxin például a kalikulin-A (CLA), amely a katalitikus alegységhez kapcsolódva megakadályozza a foszfoszubsztrát kötődését. A CLA hatékonyabb gátlószere a PP2A-nak, mint a PP1-nek.

Munkacsoportunk a PP1 és a PP2A gátlószereként azonosított több növényi eredetű, tannin típusú polifenol vegyületet is, többek között a zöld teában legnagyobb mennyiségben előforduló katechin típusú epigallokatechin-3-gallátot (EGCG), melynek apoptózist indukáló hatását számos tumoros sejtvonalban kimutatták. Kiderült, hogy az EGCG a PP1 katalitikus alegységhez kötődve a PP1c aktivitásának gátlására képes.

A sejtekben számos foszfatáz inhibitor fehérje is termelődik, amelyek általában kis molekulatömegű, hőstabil fehérjék és gátló hatásukat többnyire a treonin oldalláncukon történő foszforiláció révén fejtik ki. Ilyen fehérjék az inhibitor-1 és inhibitor-2, a 32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein, valamint a 17 kDa PKC által aktivált inhibitor (CPI-17), amely a szabad katalitikus alegység mellett a miozin foszfatáz holoenzim (MP) aktivitásának gátlására is képes. Később más CPI-17-szerű fehérjéket is leírtak (KEPI, PHI, GBPI), amelyek mindegyike hordoz egy központi PP1 holoenzim inhibitor domént (PHIN) és rendelkeznek egy konzervált aktiváló foszforilációs hellyel is, a MP-ra kifejtett gátló hatás tekintetében azonban különböznek a CPI-17-től. A LIM-kináz 2 fehérje (LIMK2) egyik izoformája, a 75 kDa molekulatömegű LIMK2v1 szintén tartalmaz egy, a PHIN doménnel nagyfokú szekvencia azonosságot mutató szakaszt, valamint a CPI-17 Thr38 oldalláncának megfelelő foszforilációs helyet (Thr596). A LIMK2v1 előfordulása, funkciói alig ismertek, fehérjeszintű expresszióját a közelmúltban mutatták ki először. 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 affinitását. Ezidáig nem vizsgálták azonban a LIMK2v1 Thr596 foszforilációjának a PP1 gátló hatásban betöltött szerepét, ezért munkánk során többek között ezt a kérdést igyekeztünk feltárni.

A miozin foszfatáz szerkezete, szabályozása és funkciói

A MP egy 38 kDa PP1 katalitikus alegységből (PP1c δ), egy 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1), valamint egy eddig ismeretlen funkciójú 20 kDa alegységből (M20) áll. A MP működését elsősorban a MYPT1 regulátor alegység szabályozza, amely kölcsönhatást létesít a katalitikus alegység és a szubsztrátmolekula között. Főbb szerkezeti elemei a PP1c-kötő KVKF szekvencia motívum, amely a MYPT1 N-terminális régiójában található, az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó domének, valamint két sejtmagi lokalizációs szignál (NLS). Elkülöníthető még egy savas oldalláncokban gazdag régió, két ionos szakasz, egy Ser/Thr-ban gazdag szakasz, illetve a középső inzert és a leucin cipzár motívumok, utóbbi azonban nem mindegyik izoformában fordul elő.

A MP szabályozása létrejöhet a regulátor alegység foszforilációja, a holoenzim disszociációja, lokalizációjának megváltozása, illetve az enzim inhibitor fehérjékkel történő gátlása révén is, melyek közül a továbbiakban a szabályozó alegység foszforilációjának lehetőségeit részletezem. A MYPT1 két legrészletesebben jellemzett gátló foszforilációs helye a Thr696 és Thr853 oldalláncok, melyeknek kiemelkedően fontos szerepük van a MP által regulált sejtfolyamatok szabályozásában. A MYPT1 Thr696 oldallánc foszforilációját számos kináz katalizálhatja (például ROCK, ILK, ZIPK, PAK, MDPK), melyek közül a ROCK (RhoA által aktivált kináz) a MYPT1 Thr853 oldallánc foszforilációjára is képes. A MP aktiválásának folyamata kevésbé jól jellemzett, de ismert, hogy a ciklikus nukleotidok koncentrációjának növekedésével lehet összefüggésben. A MP aktiválása létrejöhet az EGCG/67LR/PP2A útvonalon keresztül is. A 67LR egy nem-integrin típusú laminin receptor, amely számos daganatos sejttípusban nagymértékű expressziót mutat és az EGCG kötődéséhez szükséges sejtfelszíni receptorként is funkcionál. A 67LR az adenilát cikláz/cAMP/PKA útvonalon keresztül aktiválja a PP2A-t, amely onkoproteinek gátlásához és a tumorszupresszor merlin aktivációjához vezet. Arra utaló adatok is vannak, hogy az EGCG a 67LR-en keresztül képes a MP aktiválására, melynek szerepe lehet az EGCG-indukált sejtproliferáció csökkenésben.

A MYPT1 a simaizom sejtek mellett nem-izomsejtekben is megtalálható, és szinte valamennyi szubcelluláris frakcióban előfordul. A MP elsőként

azonosított szubsztrátja az izomkontrakció, a sejtosztódás, sejtmozgás és a sejtek letapadásának szabályozásában nélkülözhetetlen miozin II fehérje alkotóeleme, a miozin könnyűlánc (MLC20) volt, melynek MP általi defoszforilációját izomrelaxáció követi. Számos tanulmány bizonyította, hogy az ERM fehérjék defoszforilációját szintén a MP katalizálja. Az NF2 tumorsuppresszor gén termékéről, a merlinről is kiderült, hogy Ser518 oldallancán a MP defoszforilálja, ezáltal aktiválódik és részt vesz a kontaktgátlásban, valamint a növekedés gátlásában. A MP egyik legjelentősebb, a sejtciklusban fontos szerepet játszó kölcsönható fehérje a szintén tumorsuppresszor retinoblasztoma fehérje (pRb), amelynek szabályozása számos daganattípusban sérült. A pRb az E2F által közvetített gének transzkripciójának gátlása révén szabályozza a sejtciklust és a proliferációt. Munkacsoportunk leukémiás sejtekben a MP-t a pRb Thr826 oldallancának defoszforilációjában részt vevő enzimként azonosította. A MP részt vesz továbbá a génexpresszió és mitózis, valamint az erek tónusának szabályozásában, emellett neuronális szubsztrátjait is azonosították már.

A PP1 és a MP szerepe leukémiában és makrofág differenciációban

Leukémiás megbetegedések esetén - ahogyan az más daganatos elváltozások során is általánosan jellemző - a foszforilációs-defoszforilációs folyamatok kényes egyensúlya felborul. Aktiválódhatnak vagy gátlódhatnak például a túlélésben és apoptózisban szerepet játszó fontos kináz kaszkád útvonalak, mindemellett a PP1 és PP2A enzimek emelkedett aktivitását, valamint a tumorsuppresszor pRb alacsony expresszióját és hiperfoszforilált állapotát is leírták. Munkacsoportunk a PP1-gátló tautomycin (TM) és a PP2A-gátló koncentrációban alkalmazott kalikulin-A (CLA) hatását tanulmányozta leukémiás sejtek daunorubicinnel (DNR) 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. DNR kezelés hatására a pRb Thr826 oldallancának foszforilációja csökkent, ezzel szemben CLA-val kombinációban alkalmazva emelkedett pRb foszforilációt detektáltunk, ami a daganatos sejtek túlélését segíti elő. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a foszfatázok szerepének feltárása a kemoterápia vonatkozásában kiemelt jelentőséggel bírhat, mivel ezen enzimek a kemoterápia új célpontjaivá válhatnak.

A makrofág differenciáció különböző jelátviteli kaszkádok által közvetített folyamat, melynek nem megfelelő végbemenetelére számos megbetegedés vezethető vissza, többek között a túlzott mértékű makrofág differenciáció ún. ateroszklerotikus plakkok kialakulásával járó krónikus gyulladásos állapothoz, érlemezsedéshez (ateroszklerózis) vezethet, a makrofágok ezért vonzó célpontok lehetnek az ateroszklerózis kialakulását megelőző terápia fejlesztéséhez. A protein kinázok és foszfatázok a sejtek jelátviteli folyamatainak fontos szabályozóiként szerepet játszhatnak e folyamat irányításában is. Ismert, hogy HL-60 leukémiás sejtek differenciációja során a PP1 aktivitása a citoszolikus frakcióban csökken, ezzel párhuzamosan a membrán- és sejtmagi frakciókban nő, a CLA kezelés pedig fokozza a sejtek differenciációját, ami arra utal, hogy a PP1 és PP2A enzimek szerepet játszhatnak a makrofág differenciáció szabályozásában. A Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő protein foszfatáz-1A (PPM1A) fokozott expressziója a differenciáció kezdetén a sejtek letapadását, és a gyulladásos citokinek termelését gátolja. Egy újabb tanulmányban a RhoA/ROCK jelátviteli útvonal szerepét vizsgálták U937 limfóma eredetű sejtek makrofág differenciációjában, amelyben PMA indukció hatására a ROCK1 és ROCK2 expressziójának jelentős emelkedését, ezzel párhuzamosan a MYPT1 Thr853 oldallánc foszforilációs szintjének növekedését figyelték meg. Emellett a RhoA/ROCK útvonal komponenseinek csendesítése jelentősen gátolt makrofág differenciációban nyilvánult meg, ami arra utal, hogy ez az útvonal fontos szerepet játszhat a makrofág differenciáció szabályozásában. Nem vizsgálták azonban a RhoA/ROCK útvonal egyik „downstream” effektoraként szolgáló MP szerepét a differenciáció folyamatában, ezért munkánk során többek között ezen útvonal részletesebb vizsgálatát tűztük ki célul.

CÉLKITŰZÉSEK

A PP1 típusú enzimek számos fehérjét defoszforilálnak, szabályozásuk részletes megismerése a részvételükkel zajló jelátviteli utak pontosabb megértéséhez járulhat hozzá. A PP1 szabályozásának egyik lehetséges mechanizmusa az inhibitor fehérjék révén történő gátlás. A LIMK2v1 fehérje tartalmaz egy PP1-gátló szakaszt, Thr596 oldalláncának szerepe a gátló hatásban azonban nem tisztázott. A PP1 családba tartozó MP szerepét és szabályozását már széleskörűen vizsgálták, azonban részvétele a kemoszenzitivitás és makrofág differenciáció szabályozásában még nem minden részletében ismert. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján a foszfatázgátló vegyületek csökkentik a leukémiás sejtek kemoterápiás szerrel szembeni érzékenységét, emellett a MP-t a pRb foszforilációs állapotáért nagymértékben felelős enzimként azonosítottuk. Ezek alapján vizsgálni kívántuk a MP aktiválás lehetséges kemoszenzitizáló hatását kemoterápiás ágensekkel szemben. A makrofág differenciációt kiváltó ingerek szintén régóta ismertek, azonban pontos szabályozási mechanizmusa még nem tisztázott. Egy friss tanulmány a MYPT1 gátló foszforilációját katalizáló RhoA/ROCK jelátviteli útvonal szerepére utal a differenciáció szabályozásában, azonban a MP makrofág differenciációban betöltött szerepét ezidáig nem vizsgálták.

Mindezek alapján munkánk legfőbb célkitűzései az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

1. A LIMK2v1 Thr596 foszforilációját katalizáló kinázok azonosítása, a PP1 gátló hatásban betöltött szerepének vizsgálata.
2. Az EGCG révén történő MP aktiválás hatásának tanulmányozása a pRb és merlin fehérjék foszforilációs állapotára, valamint az EGCG kezelés hatásának vizsgálata leukémiás sejtek DNR-el szembeni érzékenységére.
3. A MYPT1 expressziójának és foszforilációjának vizsgálata THP-1 sejtek makrofág differenciációja során. A MP aktiválás hatásának vizsgálata a differenciálódó makrofágok proliferációs és letapadási képességére.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek tenyésztése, kezelése és lízise

A humán akut leukémia monocita THP-1 sejteket RPMI 1640, a tsA201 humán vese eredetű sejteket DMEM oldatban tartottuk, melyeket 10 % FBS-el, 2mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillin/streptomocinnal egészítettük ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében tenyésztettük.

A kemoterápiás ágenssel történő kezelések 1% FBS-t tartalmazó RPMI oldatban történtek, 5×10^5 sejt/ml sejtsűrűség mellett, 3, 24 vagy 48 órán át önmagában vagy 5 μ M EGCG-vel 1 órán át tartó előkezeléssel kombinálva.

A makrofág differenciációs kísérleteket 10 % FBS-t tartalmazó RPMI médiumban végeztük 24, 48 vagy 72 órán át 100 nM PMA vagy 100 nM D3 vitamin (VD₃) jelenlétében, önmagában, illetve 20 μ M EGCG-vel (1 óra) vagy 10 μ M H1152-vel (30 perc) történő előkezeléssel kombinálva.

A tsA201 sejteket 36 óra poszttranszfekciós idő elteltével szérummentes DMEM oldatban éhezettük egy éjszakán át, majd 5 μ M GF109203X-vel, 200 nM Gö6983-al vagy 10 μ M H1152-vel kezeltük 30 percen át, végül 50 nM CLA-t hozzáadva további 30 percen át inkubáltuk.

A sejteket RIPA pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,25% Na-deoxikolat, 2 mM EDTA frissen kiegészítve 1% proteázgátló koktéllal, 2% foszfatázgátló koktéllal ill. 1 μ M mikrocisztinnel (MC-LR)) jégen történő felkaparást követően ultrahangos vízfürdőben szonikáltuk, majd a sejtörmelék eltávolítása céljából centrifugáltuk (16 000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszót 5 x SDS mintapuffer hozzáadása után 100 °C-on 5 percig főztük.

SDS poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot

A sejtízátumokat denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el Bio-Rad MiniProtean készülék segítségével (200 V), majd nitrocellulóz membránra blottoltuk Bio-Rad Criterion Blotter készülékkel. A membrán blokkolásához, valamint az antitestek hígításához 3% BSA-t és 0,05 % Tween-20-at tartalmazó PBS vagy TBS oldatot használtunk. A mosási, blokkolási és

antitest jelölési lépéseket követően az immunreakciókat nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagenssel detektáltuk.

Flag-LIMK2v1 irányított mutagenézis és transzfekció

A Flag-LIMK2v1 Thr596 oldalláncának pontmutációit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) segítségével hoztuk létre a gyártó utasításai szerint. A PCR reakciót követően a templát DNS-t DpnI enzimmel emésztettük, majd XL-10 Gold ultrakompetens sejtekbe transzformáltuk.

A Flag-LIMK2v1 fehérje túltermeltetéséhez tsA201 sejtekbe pReceiver-M11/Flag-LIMK2v1 plazmidot juttattunk be polietilénimin (PEI) transzfekciós reagens segítségével, 1 µg DNS:2 µl PEI arány alkalmazásával. A transzfekciós mixet szérum- és antibiotikummentes tápoldatban lévő sejtekhez csepegtettük, majd 6 óra elteltével a médiumot szérummal egészítettük ki.

Immunprecipitáció

A Flag-LIMK2v1-et termelő tsA201 sejtek lízisét követően a lizátumot normál egér szérummal kapcsolt Protein A Sepharose gyantával inkubáltuk, majd az így előtisztított lizátumot anti-Flag M2 affinitás gyantához adtuk és 2 órán át 4°C-on, a csövek folyamatos forgatása mellett inkubáltuk. Centrifugálást követően a nem kötődött lizátumot pipettával leszívtuk, a gyantához kötött fehérjét ezt követően a további felhasználás céljától függően kezeltük.

Flag-LIMK2v1 *in vitro* foszforilációja és tisztítása

A rekombináns Flag-LIMK2v1 *in vitro* foszforilációját PKC és ROCK enzimekkel 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 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. A mintákat 30°C-os vízfürdőben 0, 10, 30, 60, 90, illetve 120 percig inkubáltunk és 1x SDS mintapufferrel történő főzéssel állítottuk le. Az immobilizáció és a foszforiláció sikerességét Western blot módszerrel detektáltuk.

A Flag-LIMK2v1 foszfatázgátló hatásának méréséhez az affinitás gyantához immobilizált fehérjét 0,1 µg/ml PKC jelenlétében a fent leírtak szerint, 0,2 mM

ATPγS alkalmazásával tiofoszforiláltuk, majd a gyantához kötött fehérjéket 300 µg/ml Flag-peptidet tartalmazó TBS oldattal eluáltuk. A fehérjeoldat koncentrációját 595 nm-en Bradford módszerrel határoztuk meg, a fehérjék tisztaságát pedig Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A Flag-LIMK2v1 hatását a PP1 aktivitására natív PP1c alkalmazásával határoztuk meg, amelyhez ^{32}P -al jelölt miozin könnyűláncot (^{32}P -MLC20) használtunk szubsztrátként. A PP1c-t 0,1% BSA-t tartalmazó TM pufferrel [20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% 2-merkaptoetanol] hígítottuk, majd 0-200 nM foszforilálatlan vagy tiofoszforilált Flag-LIMK2v1-el inkubáltuk 10 percig 30°C-on. A reakciót a 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 TBS-EDTA pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) lizáltuk, majd folyékony nitrogénben történő fagyasztást és szonikálást követően a lizátumot centrifugáltuk (16 000 g, 10 perc, 4°C). A felülszóból 10 µl-eket használtunk, amit 10 µl TM pufferrel egészítettünk ki. A defoszforilációt 15-30 másodpercig végeztük és a kihasított $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitását a kicsapódott fehérjék centrifugálással történő elválasztása után szcintillációs számlálóban határoztuk meg.

Immunfluoreszcencia

A THP-1 sejteket kollagénnel kezelt (5 µg/cm² kollagén, 1 óra) Cell Carrier Ultra üveg aljú 96-lyukú lemezre raktuk ki és 24 óra elteltével 3,7 % paraformaldehid oldattal 15 percig fixáltuk, majd 0,1 % Triton X-100-at tartalmazó PBS oldattal 10 percig permeabilizáltuk. A blokkolást 1 % BSA/PBS oldattal egy órán át, szobahőn végeztük. Az elsődleges antitestet 0,1 % BSA/PBS oldatban hígítottuk 1:100 arányban, melyben a sejteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Az 1:200 arányban hígított Alexa 488-konjugált anti-nyúl-IgG-vel történő 90 perc inkubálást követően a sejtmagokat 2,5 µg/ml DAPI-val 2 percig festettük. A konfokális képeket Opera Phenix High Content Screening készülékkel, 40x nagyítású vizes objektív lencsével (NA 1,1) készítettük a sejtmag fókuszíkjában.

Életképesség vizsgálata Alamar Blue tesztel

A THP-1 sejteket 96-lyukú lemezen 5×10^6 /ml sejtkoncentrációban kezeltük. A DNR-t többféle szubletális koncentrációban alkalmaztuk (0-200 ng/ml) önmagában vagy 5 μ M EGCG előkezeléssel kombinálva 24 órán keresztül. Ezután a médiumhoz Alamar Blue reagenst adtunk 20 μ M végkoncentrációban, 2 órán át inkubáltunk, majd a fluoreszcenciát 560/590 nm-en mértük Tecan Spark Multimode Plate Reader (Thermo Fischer Scientific) készülékkel.

A sejtek letapadásának vizsgálata szulforodamin B (SRB) tesztel és elektromos sejt-szubsztrát impedancia érzékelés (ECIS) méréssel

A differenciálódó makrofágok letapadásának mértékét szulforodamin B (SRB) esszével vizsgáltuk. THP-1 monocitákat 100 nM PMA-val differenciáltattunk önmagában, 10 μ M H1152 vagy 20 μ M EGCG előkezeléssel kombinálva, majd 24, 48, ill. 72 óra múlva a médiumot a le nem tapadt sejtekkel együtt eltávolítottuk és a sejtekhez 10 % (v/v) jéghideg triklórecetsavat (TCA) adtunk. A kicsapódott fehérjéket 0,4 % (m/v) SRB-t tartalmazó 1 %-os ecetsav oldattal 10 percig festettük, végül 10 mM Tris bázissal szolubilizáltuk. Az abszorbancia értékeket 515 nm hullámhosszon mértük Tecan Spark Multimode Plate Reader segítségével.

A differenciálódó sejtek letapadásának erősségét ECIS készülékkel (Applied Biophysics) vizsgáltuk. A sejteket 24-lyukú lemezen az előző bekezdésben leírtak szerint kezeltük, majd a PMA indukciót követően a sejteket azonnal 8W10E ECIS 8 elektródás tenyésztőedénybe pipettáztuk. A letapadást a rezisztencia valós idejű, percenkénti mérésével követtük nyomon 72 órán keresztül, 4000 Hz frekvenciájú elektromos impulzust alkalmazva.

Statisztikai analízisek

A statisztikai analízist és a diagramokat GraphPad Prism 8 program segítségével készítettük. Az adatok elemzése Student-féle t-tesztel vagy kétutas ANOVA módszerrel történt, *post hoc* Šidak-, Tukey- vagy Dunnett-tesztekkel. Az oszlopok legalább három független mérés átlagát, a hibásávok az adatok szórását mutatják.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A LIMK2v1 foszfatázgátló szerepének vizsgálata

A LIM kinázok számos sejtfunkció szabályozásában vehetnek részt, mint például a sejtmotilitás, sejtosztódás, differenciáció, apoptózis vagy tumorigenezis. 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. 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 *in vitro* foszforilációjának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy mind a protein kináz C (PKC), mind a ROCK enzimek foszforilálják a fehérjét a CPI-17-szerű foszforilációs szekvenciáján, a Thr596 oldalláncon. Ismert, hogy a ROCK képes a LIMK2 mindhárom izoformáját foszforilálni, LIMK2a esetén a Thr505, LIMK2b és LIMK2v1 esetén a Thr484 oldalláncokon, azonban a ROCK szerepéről a Thr596 oldallánc foszforilációjában ezidáig egyetlen tanulmány sem számolt be. Azt is leírták már, hogy a PKC a LIMK2a-t foszforilálni képes, azonban a LIMK2v1 foszforilációjában betöltött szerepét ezidáig nem vizsgálták. A LIMK2v1 foszforilációja élő sejtekben is lejátszódik, ugyanis foszfatázgátló CLA kezelés hatására megnövekedett a tsA201 sejtekben overexpresszált Flag-LIMK2v1 fehérje Thr596 oldalláncának foszforilációja. A PKC inhibitorok elhanyagolható mértékben (GF10923x és Gö6983), míg a ROCK inhibitor H1152-vel végzett előkezelés jelentősen csökkentette a Thr596 oldallánc CLA jelenlétében megfigyelhető emelkedett foszforilációját. A LIMK2v1 Thr596 oldallánc szerepének vizsgálata céljából nem foszforilálható (Thr596A) és foszforilációt mimikáló (Thr596E) mutánsokat hoztunk létre. Ezen mutánsokkal végzett immunprecipitációs kísérleteink azt mutatják, hogy a vad típusú Flag-LIMK2v1 CLA jelenlétében detektálható foszforilációja a Thr596A mutáns fehérje esetén elmarad, ami igazolja, hogy a foszforiláció ezen az oldalláncon következik be. A Thr596E mutáns fehérje kismértékben keresztreakciót mutatott az alkalmazott anti-CPI-17^{pT38} antitesttel. 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 fehérjecsald tagjaihoz hasonlóan foszforiláció révén jelentősen megnövekszik.

Napjainkban egyre több bizonyíték utal arra, hogy a LIMK2 szerepet játszhat a daganatkialakulás és áttétképződés folyamatában, mindezek pedig azt sugallják, hogy a LIMK2v1 a protein foszfatázok gátló hatású szabályozójaként a daganatok kezelésének új terápiás célpontjaként szolgálhat.

A MP szerepe THP-1 sejtek kemoszenzitivitásának szabályozásában

A daganatterápia egyik legjelentősebb problémája a daganatos sejtek kemorezisztenciájának kialakulása. Munkacsoportunk THP-1 sejtekben korábban már kimutatta, hogy a DNR-indukált sejthalál a foszfatázok aktiválásával jár együtt, a foszfatázok gátlása pedig csökkentette a sejtek DNR-el szembeni érzékenységét, amely a MYPT1 Thr696 és a pRb Thr826 oldalláncának emelkedett foszforilációjával járt együtt. Mindezek arra utalnak, hogy a MP aktiválása révén lehetőség nyílna a leukémiás sejtek kemoterápiás ágensekkel szembeni érzékenységének fokozására. A MP közvetlen aktiválására alkalmas agonista nem áll rendelkezésre, azonban ismert, hogy az EGCG kötődése a 67 kDa laminin receptorhoz (67LR) a MYPT1 Thr696 gátló foszforilációs helyének defoszforilációját, ezáltal a MP holoenzim aktiválását eredményezi. Keveset tudunk azonban arról, hogy az antiproliferatív hatással rendelkező EGCG által kiváltott foszfatáz-aktiváció hogyan járul hozzá annak sejtnövekedést gátló hatáshoz. A MP 67LR/PKA/PP2A útvonalon keresztül EGCG révén történő aktiválása lehetőséget nyújthat ezen funkciók megismerésére, ezért megvizsgáltuk e jelátviteli útvonal komponenseinek jelenlétét és a receptor lokalizációját THP-1 sejtekben. Eredményeink azt mutatják, hogy az EGCG/67LR/PKA/PP2A útvonal komponensei THP-1 sejtekben mind jelen vannak, a receptor pedig főként a citoplazmában és a plazmamembrán régióban lokalizálódik, ami arra utal, hogy a leukémia eredetű THP-1 sejtek kezelése EGCG-vel kiválthatja a MP aktiválását az EGCG/67LR/PKA/PP2A jelátviteli útvonalon keresztül.

Az EGCG előkezeléssel kombinált DNR-indukálta citotoxicitás 25, 50, ill. 100 ng/ml DNR koncentrációknál szignifikánsan megnövekedett, ami arra utal, hogy az EGCG fokozta a THP-1 sejtek DNR kezeléssel szembeni érzékenységét. A sejtproliferációs markerként használt proliferáló sejtmagi antigén (PCNA) nevű fehérje expressziójának analízise során szintén azt találtuk, hogy legjelentősebb mértékben a kombinált kezelés esetén csökkent a PCNA expressziója, ami arra utal, hogy a kombinált kezelés erőteljesebb proliferáció gátló hatással bír, mint a két szer külön-külön alkalmazva. Ismert, hogy a DNR kezelés THP-1 sejtekben apoptózist indukál, ezért a fenti kezeléseknek alávetett THP-1 sejtekben megvizsgáltuk a PARP fehérje hasadásának mértékét, mint apoptózis markert. A kombinált kezelést követően szignifikánsan emelkedett mértékű PARP hasadás volt megfigyelhető a két szer külön-külön történő alkalmazásával szemben, ami arra utal, hogy az EGCG szignifikánsan növeli a DNR által indukált apoptózis mértékét THP-1 sejtekben.

Az EGCG kezelés önmagában nem volt jelentős hatással a sejtek életképességére a hosszú távú inkubációk során (24-48 óra), azonban 4 óra elteltével jelentősen csökkentette a MYPT1 Thr696 szintjét, csakúgy, mint az önmagában alkalmazott DNR kezelés. A MP tumorszupresszor szubsztátjai foszforilációjának vizsgálata során kimutattuk, hogy az EGCG önmagában kismértékben, míg a DNR jelentősen csökkentette a pRb Thr826 oldalláncának foszforilációját. A kombinált kezelés hatására azonban markánsabb defoszforilációt figyeltünk meg mind a MYPT1 Thr696, mind a pRb Thr826 oldalláncok vonatkozásában. Az EGCG jelenlétében megfigyelt MP aktiváció magyarázhatja a pRb Thr826 oldallánc foszforilációjának csökkenését, ami részben magyarázatot adhat a kombinált kezelés hatására bekövetkező fokozott mértékű sejthalálra. A MP által defoszforilált merlin Ser518 foszforilációs szintjét önmagában sem az EGCG, sem a DNR nem befolyásolta jelentősen, azonban a két szer együttes jelenlétében jelentős mértékű (bár statisztikailag nem szignifikáns) foszforiláció csökkenés volt kimutatható, amely a fehérje Hippo jelátviteli útvonalon keresztül zajló sejtnövekedést gátló funkciójához szükséges. 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 tumorszupresszor funkcióit. Ezek a folyamatok megmagyarázhatják, hogyan képes az EGCG a THP-1 sejtek DNR-el szembeni érzékenyítésére.

A miozin foszfatáz szabályozó szerepe a makrofág differenciációban

A PP1 és PP2A enzimek számos fehérje defoszforilációja révén fontos szerepet játszanak a sejtek jelátviteli útvonalainak szabályozásában, a makrofág differenciáció folyamatában betöltött szerepükről viszont meglehetősen kevés információval rendelkezünk. A PP1 és PP2A makrofág differenciáció során bekövetkező aktivitásváltozásának vizsgálata céljából PMA stimulált THP-1 sejtek *in vitro* foszfatázaktivitását foszforilált MLC20 szubsztrát alkalmazásával mértük meg. Azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen THP-1 sejtek foszfatázaktivitása az idő előrehaladtával csökkent, azonban a PMA-val kezelt sejtek foszfatázaktivitásának csökkenése még kifejezettebb volt, ami 48 óra differenciációt követően mindössze 42 % maradék aktivitást eredményezett. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a THP-1 sejtek PMA-indukált differenciációja a PP1 és/vagy PP2A enzimek gátlásával járhat együtt. Nemrégiben kimutatták, hogy a PMA-indukált makrofág differenciáció a MP foszforilációját katalizáló ROCK aktivációját igényli, amely a specifikus szubsztrátok (MLC20, ezrin/radixin/moezin, adducin) foszforilációján keresztül részt vesz a citoskeletális folyamatok szabályozásában. E fehérjék foszforilációs szintjét kooperatív módon elsősorban a ROCK és a MP szabályozza, azonban a MP lehetséges szerepe a differenciáció folyamatában jelenleg még nem tisztázott. A MP katalitikus és regulátor alegységeinek expresszióját, illetve a regulátor alegység foszforilációjának mértékét THP-1 sejtek PMA, illetve D3 vitamin (VD₃)-indukált differenciációja során vizsgáltuk és azt találtuk, hogy sem a PP1c δ katalitikus, sem a MYPT1 regulátor alegység expressziója nem változott, azonban szignifikáns növekedést tapasztaltunk a szabályozó alegység gátló foszforilációs helyeinek foszforilációját tekintve, ami arra utal, hogy a PMA-indukált makrofág differenciációhoz a ROCK aktiválása mellett a MP egyidejű gátlása is szükséges. Az MLC20 által közvetített aktomiozin átrendeződés a monociták makrofágokká történő differenciálódásához alapvető fontosságúnak tűnik. Ezzel összhangban a MLC20 foszforilációjának szignifikáns emelkedését figyeltük meg PMA-stimuláció hatására THP-1 sejtekben. A MP farmakológiai aktiválásának a makrofág differenciációra kifejtett hatását a ROCK inhibitor H1152-vel, valamint a MP aktiválására képes EGCG előkezelés segítségével vizsgáltuk. A H1152, valamint az EGCG alkalmazása a PMA-stimulációt megelőzően szignifikánsan csökkentette mind a MYPT1 gátló foszforilációs

helyeinek, mind az MLC20 Ser19 oldalláncának 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.

PMA-differenciált makrofágokban kimutatták, hogy az EGCG a 67LR-on keresztül csökkenti a mátrix metalloproteinázok expresszióját, ami az atheroszklerotikus plakkok stabilizálásához vezethet. Ahogyan az saját vizsgálatainkból kiderült, a THP-1 sejtek PMA-stimulációt megelőző EGCG illetve H1152 kezelése jelentősen csökkentette a MYPT1 gátló helyeinek foszforilációját, aktiválva ezzel a MP holoenzimet, illetve csökkentette a MLC20 Ser19 oldalláncának foszforilációját. Figyelembe véve a MLC20 foszforilációs állapotának makrofág differenciációban betöltött fontos szerepét, eredményeink a MP aktiválás anti-ateroszklerotikus hatásait illetően hasznos új információkkal szolgálhatnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A LIMK2v1 fehérje foszfatázgátló szerepének tanulmányozása során azonosítottuk a Thr596 oldalláncot, amelyet *in vitro* enzimreakciókban mind a protein kináz C (PKC), mind a Rho-A asszociált kináz (ROCK) foszforiláltak, míg sejtes rendszerben a ROCK szerepét azonosítottuk. A foszforilált LIMK2v1 esetén jelentősen emelkedett PP1c-gátló hatást mértünk a foszforilálatlan fehérjéhez képest, ami alátámasztja hipotézisünket, miszerint a CPI-17 fehérjecsalád tagjaihoz hasonlóan a LIMK2v1 foszforilációja is szükséges az enzim hatékony foszfatázgátló funkciójának kifejeződéséhez.

2. Kimutattuk, hogy leukémiás THP-1 sejtek daunorubicinnel szembeni érzékenysége a miozin foszfatáz (MP) EGCG-vel történő aktiválása révén fokozható, ami együtt jár a daganatos sejtek csökkent proliferációjával és fokozott apoptózissal. A MYPT1 Thr696 oldalláncának csökkent foszforilációja mellett, ami a holoenzim aktív állapotára utal, megfigyeltük a MP tumorszuppresszor szubsztájainak, a retinoblasztóma (pRb) és merlin fehérjék foszforilációjának csökkenését, ami a sejtciklus gátlását eredményezheti és magyarázatot adhat a sejtek életképességének csökkenésére.

3. THP-1 monociták PMA-indukált makrofág differenciációja során megfigyeltük a PP1 és PP2A enzimek csökkent aktivitását, emellett a MYPT1 regulátor alegység gátló helyeinek emelkedett foszforilációját mutattuk ki, amely a MP holoenzim gátolt állapotára utal. A MP gátlását VD₃-indukált makrofág differenciáció során is megfigyeltük. A ROCK gátlása és a MP aktiválása az EGCG révén a 67LR/PKA/PP2A útvonalon keresztül a differenciációs markerként használt CD11b fehérje csökkent expressziójában nyilvánult meg és együtt járt a sejtek letapadási képességének csökkenésével, ami a PMA-indukált makrofág differenciáció nélkülözhetetlen velejárója. Mindemellett a MP szubsztájja, a MLC20 Ser19 oldalláncának PMA-indukált foszforilációja is jelentős csökkenést mutatott a ROCK inhibitor illetve EGCG jelenlétében, ami az aktomiozin komplex szabályozása révén szerepet játszhat a differenciáció folyamatában. Ebből arra következtettünk, hogy a makrofág differenciáció végbemeneteléhez kulcsfontosságú lehet a MP gátlása.



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 alapján szolgáló közleményekre):
8,43**

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

Debrecen, 2021.11.24.



A doktori értekezést megalapozó közlemények elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA K109249, OTKA PD111715, OTKA K129104), a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 és a TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 nyújtott támogatást.