

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

**PROTEIN FOSZFATÁZ-1 SZABÁLYOZÁSA
A REGULÁTOR ALEGYSÉG FOSZFORILÁCIÓJÁVAL ÉS
KATALITIKUS ALEGYSÉGHEZ KÖTŐDŐ INHIBITOROKKAL**

Kiss Andrea

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
MTA SEJTBIOLOGIAI ÉS JELÁTVITELI KUTATÓCSOPORT

2008

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
Protein foszfatáz-1 holoenzimek szerkezete és szabályozása.....	8
<i>A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása</i>	<i>8</i>
<i>Protein foszfatáz-1 katalitikus alegység</i>	<i>8</i>
<i>PP1 gátlása természetes toxinokkal</i>	<i>9</i>
<i>PP1c regulátor alegységek.....</i>	<i>10</i>
<i>Az inhibitor fehérjék szabályozó szerepe.....</i>	<i>11</i>
A protein foszfatáz-1 funkciói	12
<i>A PP1 szerepe a simaizom összehúzódásban</i>	<i>12</i>
A miozin foszfatáz szerkezete és szabályozása.....	13
<i>A miozin foszfatáz holoenzim felépítése</i>	<i>13</i>
<i>A MYPT1 szerkezete</i>	<i>13</i>
<i>A MYPT1 kölcsönhatásai, lokalizációja és változatos szerepe a PP1 célrairányításában ..</i>	<i>14</i>
<i>A miozin foszfatáz szabályozása</i>	<i>16</i>
<i>A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 foszforilációja révén.....</i>	<i>16</i>
<i>A miozin foszfatáz szabályozó hatása nem-izom sejtekben</i>	<i>18</i>
CÉLKITŰZÉSEK.....	22
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
<i>Anyagok</i>	<i>23</i>
<i>Antitestek</i>	<i>23</i>
<i>Fehérjetisztítási eljárások.....</i>	<i>23</i>
<i>GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása</i>	<i>24</i>
<i>Hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His) expresszált fehérjék előállítása és tisztítása</i>	<i>25</i>
<i>Sejtkultúrák és a sejtek kezelése effektorokkal</i>	<i>26</i>
<i>THP-1 sejtek szubcelluláris frakcionálása</i>	<i>26</i>
<i>Western blot</i>	<i>27</i>
<i>Protein foszfatáz aktivitás meghatározása</i>	<i>28</i>
<i>Immunprecipitáció.....</i>	<i>28</i>
<i>Pull-down vizsgálat C-terminális pRb fragmentummal</i>	<i>29</i>
<i>Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia.....</i>	<i>29</i>
<i>Metil-tiazol-tetrazólium (MTT) teszt</i>	<i>30</i>
<i>Alamar Blue proliferációs vizsgálat</i>	<i>30</i>
<i>Kaspáz-3 aktivitás mérése.....</i>	<i>30</i>
<i>Felületi plazmon rezonancia</i>	<i>30</i>

EREDMÉNYEK	32
A miozin foszfatáz szabályozó alegység Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja	32
<i>Vad típusú és mutáns MYPT1 fehérjék foszforilációja</i>	32
<i>A Thr695 és Thr850 foszforilációs helyek hatása a miozin foszfatáz aktivitásra.....</i>	34
<i>A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja A7r5 simaizom sejtekben.....</i>	35
A PP1 és PP2A enzimek gátlásának szerepe leukémiás sejtek életképességének szabályozásában	36
<i>CL-A hatása a DNR-rel kezelt THP-1 sejtek túlélésére</i>	36
<i>CL-A és DNR hatása a foszfatáz aktivitásra, valamint a pRb fehérje foszforilációjára és degradációjára</i>	37
A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációs szintjének szabályozásában	39
<i>A MYPT1 célirányító funkciója a pRb fehérje defoszforilációjában</i>	39
<i>A MYPT1 és a pRb fehérje kölcsönhatásának kimutatása immunprecipitációval és pull-down vizsgálattal</i>	43
<i>MYPT1 és pRb kölcsönhatásának jellemzése felületi plazmon rezonancia-méréssel</i>	45
<i>pRb és MYPT1 kolokalizációja és foszforilációja THP-1 sejtekben.....</i>	47
Tanninok foszfatázgátló hatásának vizsgálata.....	50
<i>Tanninok hatása PP1 és PP2A enzimek aktivitására</i>	50
<i>PGG és EGCG rPP1cδ-hoz való kötődésének vizsgálata felületi plazmon rezonancián alapuló módszerrel</i>	51
<i>A PP1c és a tannin származékok kölcsönhatásának NMR-spektroszkópiás vizsgálata és molekuláris modellezése</i>	53
<i>PGG és EGCG hatásának vizsgálata THP-1 sejtek életképességére Alamar Blue proliferációs módszerrel.....</i>	56
MEGBESZÉLÉS	58
ÖSSZEFOGLALÁS.....	67
SUMMARY	68
IRODALOMJEGYZÉK.....	69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	80
FÜGGELÉK	81

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

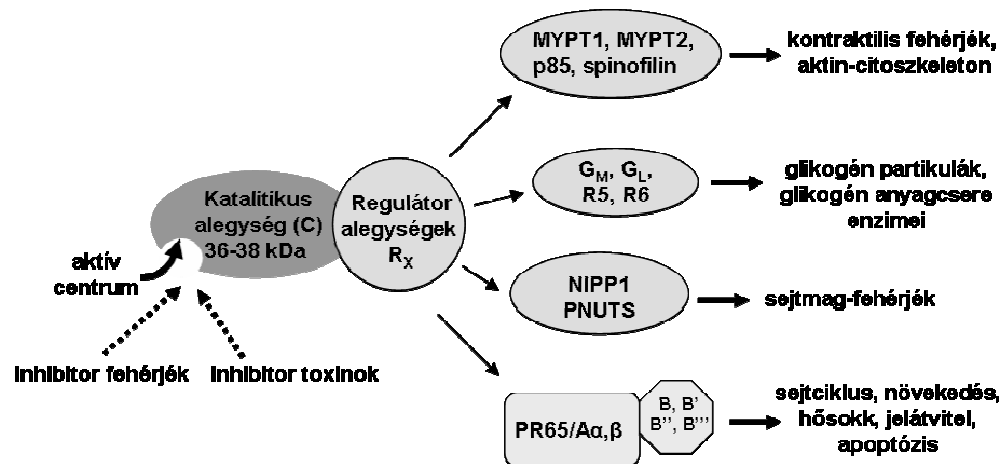
[Ca ²⁺] _i	intracelluláris Ca ²⁺ -koncentráció
A7r5	humán patkány aorta simaizom sejt
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP-γS	adenozin-5'-O-(γ-tio)trifoszfát
BSA	borjú szérum albumin
CaM	Ca ²⁺ -kalmodulin
CDK	ciklin-függő kináz
CL-A	kalikulin-A
CM	karboxi-metil dextrans
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
DARPP-32	32 kDa dopamin és cAMP által szabályzott foszfoprotein
DNR	daunorubicin
DTT	ditioteritol
ECL	nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló reagens
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGCG	epigallokatekin-3-gallát
EGTA	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
FBS	marhaszérum
GST	glutation-S-transzferáz
HepG2	humán hepatokarcinóma
His	hexahisztidin
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
IC ₅₀	50%-os enzimaaktivitás csökkenést okozó koncentráció
IP	immunprecipitáció
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
LPA	lizofoszfátidsav
M20	a miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége
MBP	maltózkötő fehérje
MC-LR	mikrocisztin-LR
MLC20	miozin 20 kDa könnyű lánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MP	miozin foszfatáz
MPH	miozin foszfatáz holoenzim
MTT	metil-tiazol-tetrazólium
MYPT1	miozin foszfatáz regulátor alegység 1
NIPPI	nukleáris protein foszfatáz inhibitor 1
NLS	sejtmagi lokalizációs szignál
OA	okadánsav
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	foszfát puffer
PGG	penta-O-galloil-D-glükóz
P _i	anorganikus foszfát
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid

PNUTS	nukleáris foszfatáz célirányító alegység
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység
PP2A	protein foszfatáz-2A
PP2B	protein foszfatáz-2B
PP2C	protein foszfatáz-2C
pRb	retinoblasztóma fehérje
pRb-C	C-terminális retinoblasztóma fragmentum
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
ROK	RhoA által aktivált kináz
rPP1c δ	rekombináns protein foszfatáz-1 delta izoforma
SDS	nátrium-dodecilszulfát
SPR	felületi plazmon rezonancia
SP-Sepharose	szulfopropil-Sepharose
STD	telítés átviteli differencia
TBS	Tris-HCl puffer
TCA	triklór-ecetsav
THP-1	humán monocita leukémiás sejtvonal

BEVEZETÉS

A fehérjék kovalens módosítása szerin (Ser), treonin (Thr) és tirozin (Tyr) oldalláncok reverzibilis foszforilációjával a sejtfolymatok szabályozásának egyik fontos mechanizmusa. Egy fehérje foszforilációs szintjét a foszfát-csoport beépülését katalizáló protein kinázok és a defoszforilációt végző foszfatázok aktivitásának aránya szabja meg. Az emlős sejteket alkotó fehérjék legalább egyharmada foszforilálható, összehangolt foszforilációjuk-defoszforilációjuk sokféle kináz és foszfatáz szabályozott működését igényli. A humán genom közel 500 protein kinázt kódol, amelyek kétharmada szerin/treonin oldalláncokat foszforilál, ugyanakkor a protein foszfatázok családja csak mintegy 150 tagot számlál, közülük 40-nél is kevesebb a szerin/treonin specifikus enzimek száma (Cohen, 2002). Ennek ellenére a foszfatázok szerepe a fehérjék foszforilációs szintjének kialakításában a protein kinázokéval egyenértékű. A változatos szerkezetű és viszonylag szelektív szubsztrátspecifitású protein kinázokkal szemben a protein foszfatáz katalitikus alegységek szerkezete nagymértékben hasonló és úgy tűnik, hogy a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységek biztosítják specifitásukat a különböző biológiai funkcióik szabályozásában.

A foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok közül kitéüntetett szerepe van a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimeknek, amelyek minden eddig vizsgált eukarióta sejtben jelen vannak, és egyes becslések szerint az összes foszfo-Ser/Thr specifikus fehérje defoszforilációjáért mintegy 90 %-ban lehetnek felelősek (Fernandez és mtsai., 2002). E két enzimtípus általános szerkezetére jellemző, hogy 36-38 kDa katalitikus alegységből és regulátor alegység(ek)ből állnak (1. ábra).



1. ábra Protein foszfatáz-1 és -2A enzimek általános szerkezete: az alegységek szerepe az enzimek szabályozásában

A katalitikus alegység aktivitásának szabályozásában a sejtekben is előfordul fehérje inhibitorok, ill. a katalitikus alegységekhez kötődő kismolekulájú effektorok játszanak szerepet. Ezek közül kiemelhetők a természetes eredetű membránpermeábilis foszfatázgátló toxinok (okadánsav, kalikulin-A, mikrocisztin, tautomycin, kantaridin származékok), amelyek alkalmasak a PP1 és PP2A sejtekben betöltött funkcióinak vizsgálatára, továbbá a különböző típusú foszfatázok szerepének részleges elkülönítésére is. A PP1 és PP2A toxinokkal történő blokkolása a sejt morfológiai megváltozását, kóros sejtranszformációt és bizonyos sejttípusok esetén sejthalált is okozhat. Ezek az eredmények a PP1 és PP2A sejtműködésben betöltött alapvető fiziológiai szerepére utalnak, azonban specifikus szerepük még nem minden tekintetben tisztázott.

A PP1 és PP2A regulátor alegységek a katalitikus alegységeket (PP1c és PP2Ac) a sejt különböző szubcelluláris frakcióihoz irányítják adapter és/vagy szubsztrátfehérjékhez történő kötődésük által. A regulátor alegység kötődése a szubsztráthoz elősegítheti a katalitikus alegységnek a katalitikus mechanizmus szempontjából kedvező pozicionálását, azaz szabályozza az enzim szubsztrátspecificitását is. Ezen kívül a regulátor alegység foszforilációjának szerepe lehet a katalitikus aktivitás szabályozásában (gátlás vagy aktiválás) is. A regulátor alegységek ezen változatos szabályozó funkciói azonban még nem minden részletében ismertek.

A fenti kérdésvetések tükrében *jelen munkánk fő célkitűzése az volt, hogy a PP1 szabályozási lehetőségeit jellemezzük, egyrészt a PP1c-hez kötődő effektorokkal, másrészt a regulátor alegység foszforilációs lehetőségeinek feltárásával.* Ez utóbbi célkitűzéshez a miozin foszfatáz (MP) PP1c-ből és 110-130 kDa molekulatömegű miozinhoz is kötődő alegységéből (MYPT1) álló holoenzimét használtuk modellként. Kimutattuk, hogy a MP aktivitását a MYPT1 alegység két különböző helyének Rho-kináz (ROK) általi foszforilációja is gátolhatja. Tanulmányoztuk továbbá a kalikulin-A (CL-A) hatását daganatos sejtek életképességére, valamint a kemoterápiás szerek apoptózist indukáló hatására. Ez utóbbi folyamatban bizonyítottuk a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációjának a szerepét, valamint azonosítottuk a MP-t, mint a fosfo-pRb defoszforilációjáért felelős egyik fő celluláris foszfatázt. Jellemeztük a természetes zöld tea polifenolok fő komponensének tekinthető epigallokatekin-3-gallát (EGCG) és a tanninok fő alkotórészének, a penta-O-galloil-D-glükóznak (PGG) PP1c-re kifejtett gátló hatását, a kölcsönhatás kinetikai és szerkezeti jellemzőit, valamint a vegyületek szerepét a daganatos sejtek életképességében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Protein foszfatáz-1 holoenzimek szerkezete és szabályozása

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása

A szerin/treonin specifikus foszfatázok biokémiai tulajdonságaik (gátló fehérjék és toxinok eltérő hatása, szubsztrátspecifitás, fémion-függőség, stb.) alapján osztályozhatók. Ezek szerint protein foszfatáz-1 (PP1) és -2 (PP2) típusokat különíthetünk el. A két típus közötti döntő eltérés, hogy a PP1 enzimek aktivitását inhibitor fehérjék (inhibitor-1 és inhibitor-2), valamint a heparin gátolják, míg a PP2 enzimek aktivitására ezek az effektorok hatástalanok (Ingebritsen és Cohen, 1983). A PP2 enzimek altípusai az aktivitáshoz extra fémion jelenlétét nem igénylő PP2A, a Ca^{2+} -kalmodulin-függő PP2B (kalcineurin), és a Mg^{2+} -függő PP2C. Az okadánsav nem befolyásolja a PP2C aktivitását, csak nagy koncentrációban gátolja a PP2B-t ($\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$), viszont hatékony, de eltérő gátló hatást fejt ki a PP2A-ra ($\text{IC}_{50} = 0,2 \text{ nM}$) és a PP1-re ($\text{IC}_{50} = 20 \text{ nM}$).

Vizsgálataink a protein foszfatáz-1 enzimre és annak szabályozására irányultak, ezért a továbbiakban elsősorban a PP1-re és PP1-kötő fehérjékre vonatkozó irodalmi eredményeket ismertetem.

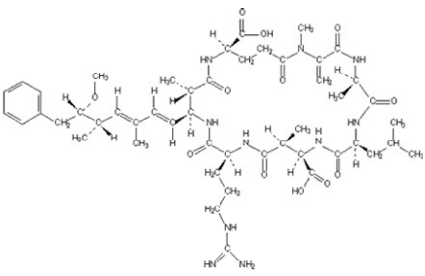
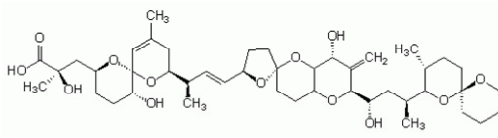
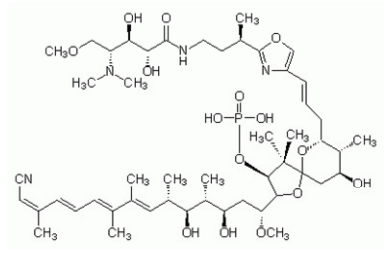
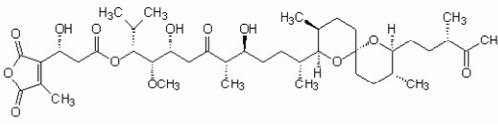
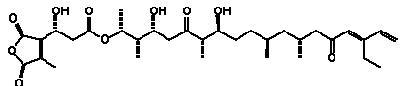
Protein foszfatáz-1 katalitikus alegység

A protein foszfatáz-1 katalitikus alegység (PP1c) (36-38 kDa) valamennyi eukarióta szervezetben és eddig vizsgált sejttypusban expresszálódik. Az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje. Emlősejtekben három PP1 gén található, amelyek a $\text{PP1}\alpha$, $\text{PP1}\gamma$ és $\text{PP1}\beta/\delta$ izoformákat kódolják. A $\text{PP1}\gamma$ két, alternatív RNS-szerkesztéssel („splicing”) keletkező variánsa a $\text{PP1}\gamma_1$ és a $\text{PP1}\gamma_2$. A tesztisz-specifikus $\text{PP1}\gamma_2$ kivételével valamennyi emlős izoforma általánosan expresszálódik, de sejten belüli lokalizációjuk eltérő (Andreassen és mtsai., 1998). Az izoformák nagyfokú szekvencia hasonlóságot (~90%) mutatnak, és *in vitro* nem különböztethetők meg szubsztrátspecifitásuk vagy regulátor alegységekkel való kölcsönhatásuk alapján (Zhang és mtsai., 1993). A katalitikus alegység önmagában számos fehérje defoszforilációját képes katalizálni. A sejtben azonban a PP1c-hez egy vagy több regulátor alegység kapcsolódik, amelyek módosítják az így kialakuló holoenzim aktivitását, és a katalitikus alegységet a célfehérjéhez irányítják. Bár a PP1c aktivitását Thr320 oldalláncának sejtciklus-függő foszforilációja is gátolhatja (Kwon és mtsai., 1997), a PP1 holoenzimek szabályozása elsősorban a regulátor alegységeken keresztül valósul meg.

A PP1c kristályszerkezetét a mikrocisztin inhibitorral (Goldberg és mtsai., 1995), a foszfátanalóg wolframáttal (WO_4^{2-}) (Egloff és mtsai., 1995), a glikogén-kötő alegység rövid peptidszakaszával (Egloff és mtsai., 1997), okadánsavval (Maynes és mtsai., 2001) és kalikulin-A-val (Kita és mtsai., 2002), valamint a MYPT1 szabályzó alegység N-terminális peptidjével (Terrak és mtsai., 2004) együtt kristályosítva határozták meg. A PP1c N- és C-szubdoménokra tagolható. Az N-szubdomén kompakt szerkezetet alkot, és magában foglalja az enzimaktivitás szabályozásában szerepet játszó aktív centrumot. Az aktív centrum két fémiont, feltételezhetően Fe^{2+} - és Zn^{2+} -ionokat koordinál, amelyek egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén elősegítik a szubsztrátmolekula foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét. Az aktív centrum az N-domén Y-alakú katalitikus árkanak elágazásában helyezkedik el. A katalitikus árok három ága, a C-terminális, a hidrofób- illetve a savas-árok közül az utóbbi kettőnek van jelentősége a szubsztrátok kötődésében.

PP1 gátlása természetes toxinokkal

A PP1c katalitikus aktivitását a természetben előforduló és különböző organizmusok által termelt membránpermeábilis toxinok is gátolhatják. Ilyen toxin a mikrocisztin-LR (MC-LR), egy ciklikus heptapeptid, amely részben a két fémion által kötött vízmolekulával lép kapcsolatba, valamint a hidrofób árokba kötődve lefedi a katalitikus centrum egy részét, ezzel gátolja a foszfo-szubsztrát kötődését és hidrolízisét. A kialakuló gátlás irreverzibilis, ugyanis a mikrocisztin kovalens kapcsolatot létesít a katalitikus alegység Cys-273 oldalláncával (Goldberg és mtsai., 1995). A poliéter zsírsav okadánsav (OA) szintén a hidrofób árokkal lép kölcsönhatásba, és hidrogénkötést hoz létre a Tyr-272 oldallánccal, valamint a katalitikus centrum bázikus aminosavainak oldalláncaival (Maynes és mtsai., 2001). A kalikulin-A (CL-A) foszfátcsoportjával kapcsolódik a fémion-kötőhelyhez, és szoros kölcsönhatást létesít a hidrofób és a savas árkokkal (Kita és mtsai., 2002). Ezek a toxinok a PP1 mellett a PP2A enzim aktivitását is gátolják. A MC-LR mindkét enzimet azonos mértékben gátolja, míg az OA és a CL-A egyaránt hatékonyabb gátlószere a PP2A-nak. Ezzel szemben a tautomycin és egyik származéka a tautomicetin a PP1 aktivitását hatékonyabban gátolja, mint a PP2A-t. A toxinok szerkezete és a gátlásra jellemző IC_{50} értékek a 2. ábrán láthatók. Szelektív gátló hatásuk miatt ezek az inhibitorok fontosak a PP1 és PP2A enzimek megkülönböztetésében *in vitro*, valamint élő sejtben betöltött szerepük vizsgálataiban is (Favre és mtsai., 1997).

	IC ₅₀ PP1	IC ₅₀ PP2A
mikrocisztin LR 	0,2 nM	0,2 nM
okadánsav 	20 nM	0,2 nM
kalikulin-A 	0,5-2 nM	0,1-1 nM
tautomicin 	1 nM	10 nM
taumocetin 	1,6 nM	62 nM

2. ábra Membránpermeábilis foszfátázgátló toxinok szerkezete és gátló hatásukra jellemző IC₅₀ értékek

PP1c regulátor alegységek

A PP1 katalitikus alegységek szubsztrátspecifitása szabad formában széles és más típusú foszfátázokkal is átfed. A sejtekben azonban a PP1c nem szabadon, hanem szabályozó alegységekkel holoenzimet alkotva fordul elő. Több mint 50 PP1c-kötő fehérje ismert (<http://pp1signature.pasteur.fr>), amelyek katalitikus alegységre gyakorolt hatásuk alapján az úgynevezett „célra irányító” fehérjék és aktivitást módosító/gátló fehérjék csoportjába sorolhatóak. A „célra irányító” fehérjék a katalitikus alegységhez kapcsolódnak, és azt a szubsztrát fehérjéhez vagy a szubsztrátot tartalmazó szubcelluláris kompartmenthez (glikogén, miozin, citoplazma, citoskeleton, sejtmembrán, sejtmag, centroszóma, riboszóma,

mitokondrium) „rögzítik”, emellett gyakran befolyásolják a katalitikus alegység szubsztrátfehérje iránti aktivitását. A regulátor alegységek reverzibilis foszforilációja, általában másodlagos hírvivő molekulák hatásának közvetítése révén, befolyásolhatja a katalitikus alegységgel történő asszociációját és az enzim aktivitását is (Cohen, 2002).

A kölcsönható fehérjék szerkezete igen változatos, szekvencia hasonlóság csak izoformák esetén található. A nagyfokú változatosság ellenére azonban általában megtalálható ezekben a fehérjékben egy rövid szekvenciamotívum (K/R-x₁-V/I-x₂-F/W, továbbiakban RVxF), amely specifikus kötődést biztosít a katalitikus alegységhez (Egloff és mtsai., 1997). A PP1c-kötő motívumot elsőként az inhibitor-1 fehérjében azonosították (Endo és mtsai., 1996). A kötőmotívum és a PP1c között kialakuló kapcsolat szerkezeti sajátosságaira a PP1c és a G_M alegység kötőmotívumot tartalmazó peptidszakaszával (13 aminosav) alkotott komplexének röntgenkrisztallográfiai analízise szolgáltatott adatokat. A kötőmotívum a PP1c-vel a katalitikus centrumtól távol eső felszíni hidrofób régió keresztül létesít kölcsönhatást (Egloff és mtsai., 1997). A kölcsönhatást erősíthetik a kötőmotívumot megelőző bázikus aminosavak és a PP1c savas oldalláncai között kialakuló kapcsolatok is. A PP1c-kötőmotívumot tartalmazó regulátor alegységek esetén a motívum jelenléte esszenciális a kölcsönhatás kialakulásában, amelyet más, másodlagos kötőhelyek is erősíthetnek (Tóth és mtsai., 2000b). A másodlagos kötőhelyeknek szerepe lehet a PP1c katalitikus aktivitásának szabályozásában is. Egyes kölcsönható fehérjék csak PP1c-kötőhellyel rendelkeznek, ezek a fehérjék gyakran az enzim szubsztrátjai is (Ceulemans és mtsai., 2002). Ilyen például a retinoblasztóma fehérje (Durfee és mtsai., 1993), a NimA-függő kináz 2 (Nek2) (Helps és mtsai., 2000), az AKAP149 (Steen és mtsai., 2000) vagy a Bcl-2 (Ayllon és mtsai., 2001).

Az inhibitor fehérjék szabályozó szerepe

A foszfatáz inhibitor fehérjék legtöbbször viszonylag kis molekulatömegű (14-32 kDa), hőstabil fehérjék. Ezek nem a PP1c célra irányításában vesznek részt, hanem a PP1c-hez kötődve szabályozzák annak aktivitását. A citoszolikus inhibitor-1 (I-1) (Huang és Glinsmann, 1976), a DARPP-32 (32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein) (Hemmings, Jr. és mtsai., 1984), valamint a CPI-17 (17 kDa PKC által aktivált inhibitor) (Eto és mtsai., 1997) PP1c gátló hatását treonin oldalláncukon történő foszforiláció után fejtik ki. Az I-1 és DARPP-32 PKA (cAMP függő protein kináz), míg a CPI-17 PKC (protein kináz C) által foszforilálható. Az inhibitor fehérjékben a foszforilált treonin és a környezetében lévő aminosavak szubsztrátanalóggként viselkedve a PP1c katalitikus centrumának közelében kötődnek és gátolják az enzim aktivitását (Goldberg és mtsai., 1995). Az I-1 általánosan

előforduló fehérje, míg a DARPP-32 expressziója elsősorban az agyra jellemző. A CPI-17 a simaizomban és agyban fordul elő, és a miozin foszfatázra specifikus inhibitornak tekintik. Az inhibitor-2 (I-2) az eddigiekkel ellentétben defoszforilált állapotban gátolja a PP1c aktivitását (Huang és mtsai., 1976). Korábbi hipotézisek szerint a PP1c-I-2 komplex citoszolikus PP1c raktárként funkcionálhat. Az I-2 segít a PP1c natív térszerkezetének kialakításában, ezzel tehát dajkafehérje (chaperon) funkciót is betölthet (Alessi és mtsai., 1993; MacKintosh és mtsai., 1996).

A protein foszfatáz-1 funkciói

A változatos szerkezetű és funkciójú fehérjékkel kialakított kölcsönhatások révén a PP1 olyan folyamatokban játszik kulcsszerepet, mint a sejtciklus, az anyagcsere, a transzkripció, a transláció, a sejt motilitás, idegi folyamatok és a szaporodás szabályozása. Az irodalmi áttekintés szűkös terjedelme miatt mindezek bemutatására nem kerülhet sor, ezért a továbbiakban a kísérletekhez modellként szolgáló miozin foszfatáz szerkezetét és szabályozási lehetőségeit ismertetem.

A PP1 szerepe a simaizom összehúzódban

A miozin defoszforilációját a PP1 katalizálja, a célirányító funkciót a MYPT1 fehérje tölti be. A miozin-II foszforilációja sokféle sejt folyamatban játszik kulcsszerepet, például a simaizom és nem-izom sejtek kontrakciójában, a sejtek motilitásában, adhéziójában, a citokinézisben, a citoskeleton átrendeződésében és trombociták aktiválásában (Matsumura és Hartshorne, 2007). A miozin-II az aktinnal asszociálódó kontraktilis fehérje, amely két miozin-II nehézláncból (200-204 kDa) és a nehézláncokhoz kapcsolódó két könnyűláncból (17 kDa és 20 kDa) áll. A miozin 20 kDa könnyűláncának (MLC20) foszforilációja az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja, míg a defoszforiláció elernyedést (relaxációt) eredményez. A simaizom kontrakció mechanizmusának klasszikus elmélete szerint agonisták hatására vagy a membrán depolarizációjával növekszik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$), amely Ca^{2+} -kalmodulin (CaM) komplex kialakulását és CaM-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) aktivitásának növekedését, és a miozin foszforilációs szintjének emelkedését okozva izomösszehúzódbást eredményez. A $[Ca^{2+}]_i$ csökkenésével előtérbe kerül a miozin defoszforilációja, amelynek révén az izom relaxációja következik be. E mechanizmusban a miozin foszfatázt sokáig állandó aktivitású enzimnek tekintették, amelynek az aktivitását a megnövekedett miozin kináz aktivitás ellensúlyozza. Azonban kimutatták, hogy a foszfatáz membránpermeábilis toxinokkal történő gátlása önmagában is

izomkontrakciót és miozin foszforilációt indukál, alacsony $[Ca^{2+}]_i$ és MLCK aktivitás mellett is (Takai és mtsai., 1987). Ezek az eredmények a defoszforilációs folyamat szabályozásának fontosságára irányították a figyelmet, valamint arra is utaltak, hogy a MLCK mellett más, Ca^{2+} -tól független kinázok is részt vehetnek a miozin foszforilációjában. Alacsony $[Ca^{2+}]_i$ mellett megvalósuló miozin foszforilációt figyeltek meg GTP γ S-el kezelt permeabilizált simaizmokban. A folyamat molekuláris hátterét tanulmányozva kimutatták, hogy a GTP γ S a GTP-kötő RhoA fehérjét aktiválja, amely a RhoA aktivált protein kináz (ROK) aktivitását növeli. A ROK foszforilálja a miozint és a miozin foszfatáz MYPT1 alegységét (Somlyo és Somlyo, 2003a). Ez utóbbi foszforiláció a miozin foszfatáz gátlását eredményezve segíti elő a miozin foszforilációs szintjének növekedését. Az állandó (és viszonylag alacsony) $[Ca^{2+}]_i$ jelenlétében a foszfatáz gátlásával párhuzamosan kifejlődő kontrakció és miozin foszforiláció jelenségét Ca^{2+} -szenzitizációnak nevezik. Ezzel szemben a miozin foszfatáz aktiválása Ca^{2+} -deszenzitizációt okoz. Ez a hatás gyakran a ciklikus nukleotidok (cAMP, cGMP) intracelluláris szintjének növekedéséhez, illetve ezen hírvivők által aktivált protein kinázokhoz (PKA, PKG) kötött (Wu és mtsai., 1996; Lee és mtsai., 1997), de a mechanizmus még nem minden részletében tisztázott. A miozin foszfatázhoz köthető szabályozási folyamatok meggyorsították ezen enzim szerkezetének feltárását és jellemzését.

A miozin foszfatáz szerkezete és szabályozása

A miozin foszfatáz holoenzim felépítése

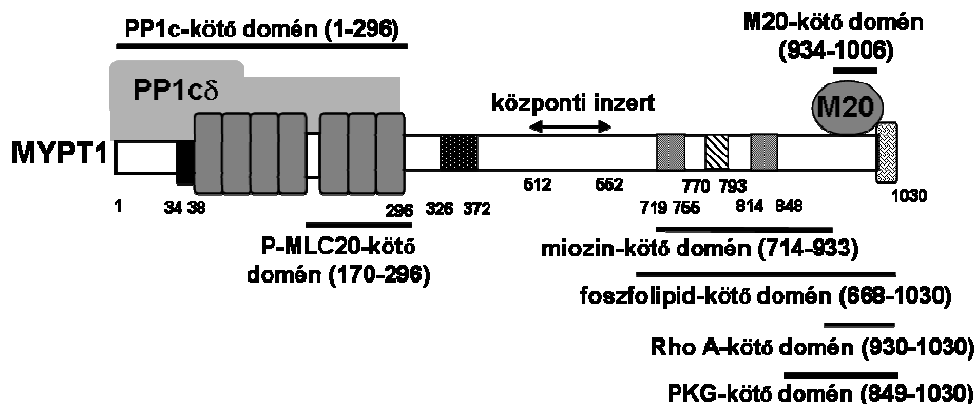
A miozin foszfatáz holoenzim (MP) heterotrimer, egy 38 kDa protein foszfatáz-1 katalitikus alegységből (PP1c δ), egy 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1), valamint egy 20 kDa alegységből (M20) áll (Alessi és mtsai., 1992). Az M20 alegység funkciója nem ismert. Az enzim működésének irányításában a MYPT1 alegység tölti be a fő szerepet, mivel kölcsönhatást létesít a PP1c δ katalitikus alegység és a szubsztrát molekula között. Célrányító funkciójára utal a MYPT1 elnevezés is (myosin phosphatase target subunit 1). Az irodalomban más elnevezések is használatosak a MYPT1-re, mint például M₁₁₀, MBS (myosin binding subunit) és M130/133.

A MYPT1 szerkezete

A MYPT1 alegységeket elsőként csirke zúza (Shimizu és mtsai., 1994) és patkány aorta (Chen és mtsai., 1994) könyvtárból klónozták, és kimutatták egy hosszabb (133 Da) és egy rövidebb (110-130 kDa) izoforma létezését is. A különböző MYPT1 izoformák

ugyanarról a génről íródnak át, és a 12q15-q21.2 humán kromoszómán található. A kazetta-típusú RNS-szerkesztési variánsok közötti különbségek a középső inzert (123 nukleotid, 512-552 inzert) illetve a leucin cipzár jelenlétének vagy hiányának tulajdoníthatók. A részletesebben tanulmányozott MYPT1 mellett ismertek más MYPT izoformák is, mint például a MYPT2 (Fujioka és mtsai., 1998), valamint MYPT-hez hasonló fehérjék, mint a MBS85 (Tan és mtsai., 2001), a MYPT3 (Skinner és Saltiel, 2001) és a TIMAP (Cao és mtsai., 2002).

A MYPT1 jellegzetes része az N-terminális végén (35-38 aminosavak) található KVKF PP1c-kötőmotívum és az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó szakasz (39-296). Két sejtmagi lokalizációs szignál (NLS) is előfordul a molekulában, amelyek közül az egyik az N- (27-33), másik a C-terminális (845-854) részen helyezkedik el. A MYPT1 fehérje további elkülönülő szakaszai a 326-372 aminosavak közötti savas oldalláncokban gazdag régió, a 719-755 és a 814-848 aminosavak között található ionos szakaszok, a Ser/Thr-ban gazdag 770-793 aminosavak által bezárt szakasz, valamint a molekula közepén található inzert (512-553), amelynek jelenléte vagy hiánya az eltérő molekulatömegű (130-133 kDa) izoformákat eredményezi. A C-terminális jellemző szakasza a leucin cipzár motívum (1006-1030), amely azonban nem mindegyik izoformában fordul elő (3. ábra).

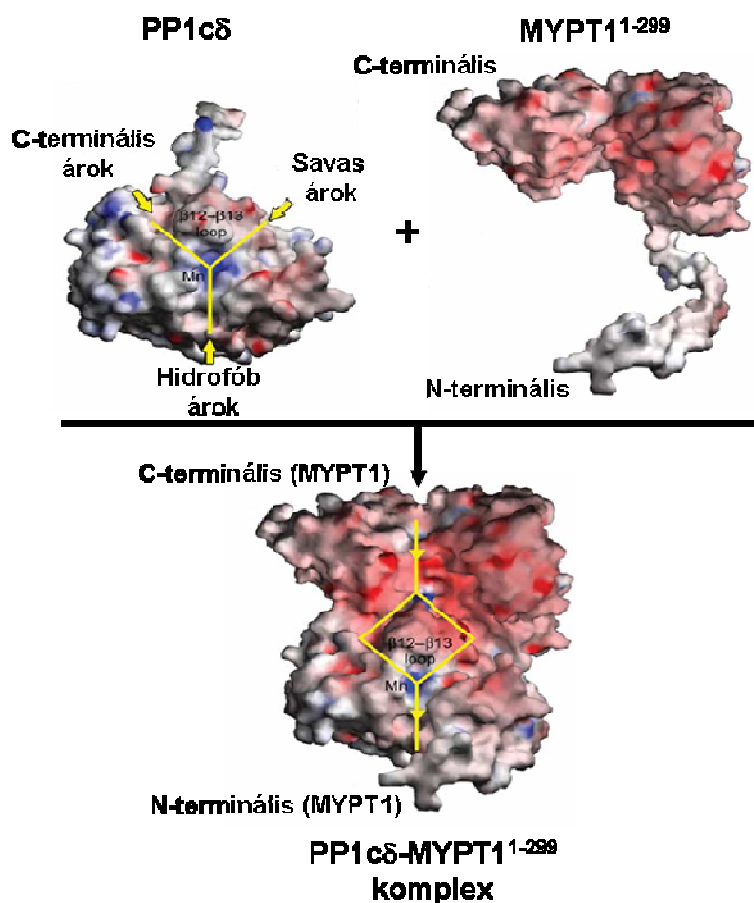


2. ábra A humán MYPT1 izoforma szerkezete (Ito és mtsai., 2004)

A MYPT1 kölcsönhatásai, lokalizációja és változatos szerepe a PP1 célirányításában

A MP szubsztrát és szabályzó fehérjéi a MYPT1 N- és C-terminális régióikhoz egyaránt kapcsolódhatnak. A PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régióinak van alapvető szerepe, amelyek közül elsődleges fontosságú a ³⁵KVKF³⁸ kötőmotívum. A kötőmotívum kapcsolódása további három MYPT1 régió kötődését indukálja, amelyek stabilizálják a kölcsönhatást. A PP1c-kötőmotívum kötődését a MYPT1¹⁻²² régió

kapcsolódása követi, amely elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ illetve a savas régiót tartalmazó MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ kötődését is (Tóth és mtsai., 2000b). Ezen kölcsönhatásokat a MYPT1¹⁻²⁹⁹ fragmentumból és a PP1c δ -ból álló komplex kristályosítása és röntgenszerkezeti vizsgálata is bizonyította (Terrak és mtsai., 2004). A MYPT1 2560 Å² felszínén érintkezik a PP1c δ -val, és ez a kölcsönhatás a PP1c δ Y-alakú katalitikus árának szerkezeti újrendeződését is eredményezi. A MYPT1 1-22 peptidszakasza ugyanis úgy kapcsolódik a PP1c-hez, hogy az a katalitikus árok hidrofób szárának meghosszabbításával a kialakult holoenzim katalitikus aktivitását növelni képes a miozin szubsztrát iránt (4. ábra).



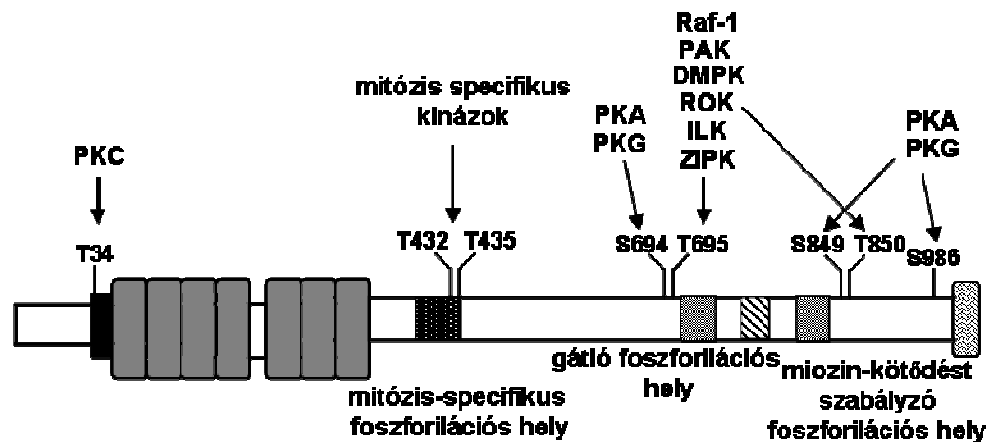
4. ábra A PP1c δ -MYPT1¹⁻²⁹⁹ komplex kristályszerkezete

A foszforilált miozinnal és a MLC20-szal való kölcsönhatásban az N-terminális, ankirinszerű ismétlődések és a C-terminális szerkezeti részek is szerepet játszanak (Ichikawa és mtsai., 1996a; Johnson és mtsai., 1997). Az adducin az ankirinszerű ismétlődésekhez (Amano és mtsai., 2000), a moezin a molekula C-terminális régióihoz kötődik (Amano és mtsai., 2000). A MYPT1 C-terminális régiója emellett foszfolipidekhez (Ito és mtsai., 1997) és az M20 (Hirano és mtsai., 1997) alegységhez is kapcsolódik.

A miozin foszfatáz szabályozása

A miozin foszfatáz szabályozásában az enzim aktivitását növelő (aktiváló), illetve az aktivitást csökkentő folyamatok is szerepet játszhatnak. A szabályozás lehetséges mechanizmusai között szerepel a MP holoenzim teljes vagy részleges disszociációja és/vagy lokalizációjának megváltozása, a MYPT1 regulátor alegység foszforilációja, és különböző gátló fehérjékkel (például CPI-17) való kölcsönhatás is.

A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 foszforilációja révén



5. ábra A MYPT1 regulátor alegység szabályozása

A MYPT1 nagyszámú foszforilációs helyének foszforilációja a MP aktiválását és gátlását egyaránt eredményezheti (Hirano és mtsai., 2004). Először a Thr695 (zúza izoformának megfelelő számozás) foszforilációjának a MP aktivitására kifejtett gátló hatását mutatták ki egy, a MP holoenzimmel asszociáló kináz által (Ichikawa és mtsai., 1996b). A Thr695 foszforilációját katalizáló kinázként elsőként a Rho-kinázt (ROK) azonosították (Feng és mtsai., 1999), később azonban kiderült, hogy számos más kináz, köztük az ILK (integrinekhez kapcsolódó kináz) (Kiss és mtsai., 2002; Murányi és mtsai., 2002), a ZIP kináz (leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz, 52-54 kDa) (Niuro és Ikebe, 2001), a MYPT1-kináz (MacDonald és mtsai., 2001a), a p21-aktivált protein kináz (PAK) (Takizawa és mtsai., 2002a), az MDPK (Murányi és mtsai., 2001), valamint a Raf-1 kináz (Broustas és mtsai., 2002) szintén képes a MYPT1 gátló foszforilációs helyét foszforilálni. Shin és munkatársai a MYPT1 és PP1c disszociációját figyelték meg simaizom sejtek PGF_{2α}-val és noradrenalinval kiváltott kontrakciója során (Shin és mtsai., 2002), amely együtt járt a MYPT1 Thr695 oldalláncának foszforilációjától függő membrán-transzlokációjával is. Hasonló transzlokációs jelenségek HepG2 sejtek okadánsavval történő kezelése során is

megfigyelhetők (Lontay és mtsai., 2005). E jelenség szerepe a MP szabályozásában azonban részleteiben még nem tisztázott.

A ROK a MYPT1 Thr695 oldallánca mellett a Thr850 foszforilációját is katalizálja. A kezdeti vizsgálatok azt sugallták, hogy a Thr850-es foszforiláció a MYPT1 és miozin közötti kölcsönhatás gyengítése révén befolyásolja az enzim működését (Velasco és mtsai., 2002). A Thr850 foszforilációnak az enzim aktivitására kifejtett hatását azonban részleteiben még nem tanulmányozták.

A PP1c-kötőmotívum szomszédságában található Thr34 oldallánc foszforilálódik a protein kináz C (PKC) által, de a foszfátcsoport beépülése nincs hatással a holoenzim aktivitására (Tóth és mtsai., 2000a). A PKC a MYPT1-et az ankirinszerű ismétlődő régióban is foszforilálja. E módosítás következtében gyengül a MP alegységei közötti kölcsönhatás, valamint csökken a miozin szubsztráttal szembeni affinitás is (Tóth és mtsai., 2000a).

A gátló hatások mellett a MYPT1 foszforiláció az enzim aktiválását is eredményezheti. Ciklikus nukleotid-függő kinázok, a protein kináz A (PKA) vagy a protein kináz G (PKG) a MYPT1 Ser691, Ser694 és Ser849 oldalláncait foszforilálják (Wooldridge és mtsai., 2004). A Ser694 a gátló foszforilációs hely (Thr695) szomszédságában található. Foszforilációja nincs közvetlen hatással a holoenzim aktivitására (Nakamura és mtsai., 1999), ugyanakkor megakadályozza a MYPT1 Thr695 oldallancának ROK általi további foszforilációját (Wooldridge és mtsai., 2004), kivédve ezzel a MP gátlását.

A MYPT1 centrális részét (Thr432, Thr435) mitózis során aktiválódó kinázok foszforilálják, és ez a foszforiláció a miozin iránti affinitás növelésével képes a foszfatáz aktivitást növelni (Totsukawa és mtsai., 1999).

A CPI-17 foszforiláció függő miozin foszfatáz gátló fehérje (Eto és mtsai., 1995). A CPI-17 Thr38 oldallancának foszforilációja PKC-vel mintegy ezerszeresére növeli foszfatázgátló képességét. A CPI-17 valamennyi PP1 holoenzim közül szelektíven gátolja a miozin foszfatáz enzimkomplexet (Eto és mtsai., 2004). A foszforilált inhibitor a PP1 aktív helyéhez kötődik, és stabil, inaktív komplexet alakít ki a MYPT1-gyel asszociált katalitikus alegységgel. A foszfo-CPI-17 más regulátor alegységet tartalmazó holoenzimekhez is kapcsolódhat, ahol azonban defoszforilálódik és disszociál a komplexből. A miozin foszfatázhoz való kötődésében a CPI-17 középső doménja játszik szerepet, a miozin foszfatáz defoszforiláló hatásától az itt található Tyr41 oldallánc védi meg (Hayashi és mtsai., 2001). Számos kináz foszforilálhatja *in vitro* a CPI-17 Thr38 oldallancát, így például a ROK (Koyama és mtsai., 2000), a PKN (protein kináz N) (Hamaguchi és mtsai., 2000) (mindkettő RhoA által aktiválódó kináz); a MYPT1-kináz (MacDonald és mtsai., 2001b), az ILK (Deng

és mtsai., 2002), a PAK (p21-aktivált kináz) (Takizawa és mtsai., 2002a), a PKA (Dubois és mtsai., 2003) és PKG (Erdődi és mtsai., 2003). Megjegyzendő, hogy ezek a kinázok - a PKN, a PKA és a PKG kivételével - a MYPT1-et is foszforilálják a gátló helyen (*in vitro* és/vagy *in vivo*).

A PP2A, PP2B és PP2C enzimek *in vitro* defoszforilálják a foszfo-CPI-17-t, míg a PP1-gyel a defoszforiláció nem játszódik le (Takizawa és mtsai., 2002b). Kevés adat található az irodalomban a foszfo-MYPT1 defoszforilációjára vonatkozóan. Feltételezhetően a PP2A felelős a Thr850 foszforilációs hely defoszforilációjáért, de a Thr695 oldallánc defoszforilációjában kevésbé hatékony (Takizawa és mtsai., 2002b; Lontay és mtsai., 2005).

A miozin foszfatáz szabályozó hatása nem-izom sejtekben

A kezdeti feltételezésekkel ellentétben a MYPT1 nemcsak simaizom sejtekben, hanem nem-izomsejtekben is, és csaknem a sejt valamennyi szubcelluláris frakciójában megtalálható. Humán hepatokarcinóma (HepG2) sejtekben a MYPT1 legnagyobb mennyiségben a sejtmagi, citoskeletális és a mikroszóma-mitokondrium frakciókban koncentrálnak, de jelen van a citoszolban és a plazmamembránban is (Lontay és mtsai., 2005). Sejt és szubcelluláris szinten a MYPT1 széleskörű és változatos lokalizációját észlelték az idegrendszerben is (Lontay és mtsai., 2004). A MP sejtmagi funkciójával kapcsolatban kimutatták szerepét HDAC7 defoszforilációjában (Parra és mtsai., 2007). MYPT1-GFP transzfekciós kísérletek szintén a MYPT1 sejtmagi lokalizációjára és ennek a sejtek életképességét csökkentő hatására utaltak (Wu és mtsai., 2005). Összességében tehát a MP változatos sejten belüli lokalizációja és nagyszámú fehérjével való kölcsönhatása azt bizonyítja, hogy a foszforilált miozinon kívül más szubsztrátok defoszforilációjában is szerepet játszhat.

A PPI és a MP lehetséges szerepe a sejtciklus szabályozásában

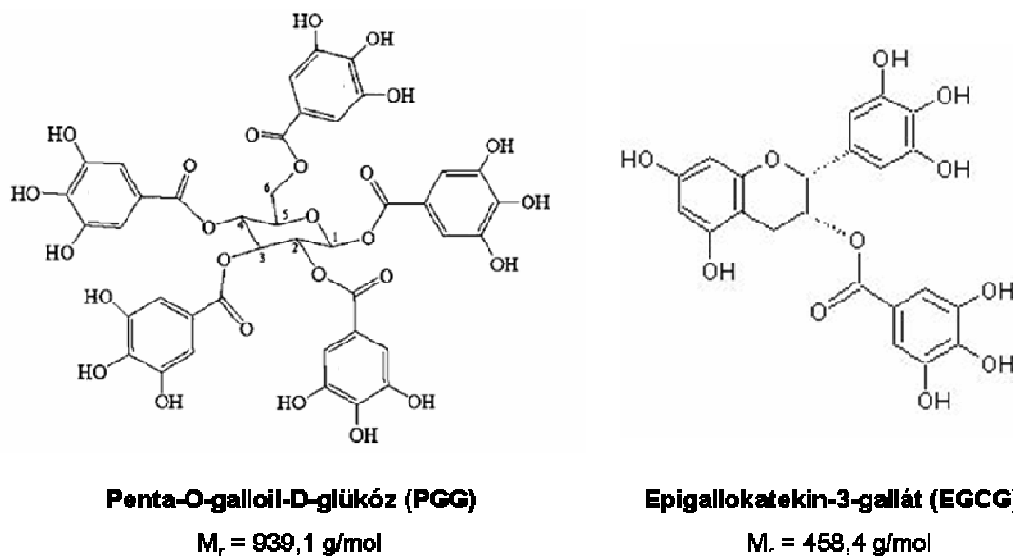
A sejtmagban található retinoblasztóma fehérje (pRb) a tumorszupresszor retinoblasztóma gén terméke, a sejtciklus szabályozásának egyik központi eleme (Mittnacht, 2005). Gátolja a sejtek proliferációját, funkciójának kiesése daganatok kialakulásához vezet. Hatását fehérje-fehérje kölcsönhatások révén fejt ki. Az E2F és más transzkripciós faktorokhoz kapcsolódva gátolja azoknak a géneknek az expresszióját, amelyek termékei fontosak az S-fázisba történő belépéshez. A pRb fehérje több mint 30 celluláris fehérjéhez képes kötődni a transzkripciót szabályozó fehérjéktől egészen a kromatin átrendeződést szabályozó enzimekig. Ezek a fehérje-fehérje kölcsönhatások a pRb változatos szerkezetében előforduló különböző doméneknek tulajdoníthatók (Tamrakar és mtsai., 2000b). Valamennyi

partnerrel való kölcsönhatást nagymértékben befolyásolja a pRb foszforilációs állapota (Mittnacht, 1998). Nyugvó sejtben a pRb alulfoszforilált formájában van jelen, és kifejti növekedésgátló hatását. Az extracelluláris szignálok hatására hiperfoszforilálódott pRb kölcsönható képességei megváltoznak, és a partnerfehérjékkel alkotott komplexei felbomlanak. A felszabaduló E2F transzkripciós faktor ezután aktívvá válik, és beindítja a G1/S átmenethez szükséges fehérjék szintézisét (Chellappan és mtsai., 1991). A pRb foszforilációját a ciklin-függő kinázok katalizálják. A foszforilációs kaszkádot a ciklin D/CDK4 komplex indítja be. A G1 fázis közepén a ciklin E/CDK2 dimer foszforilálja tovább a pRb-t, majd a G1/S fázis határán a ciklin A/CDK2 katalizálja további foszfátcsoportok beépülését. A G1 fázis CDK kinázainak működését a ciklinekkel való komplexképzés mellett a katalitikus alegység gátló vagy aktiváló foszforilációja, valamint általános ciklin-függő kináz inhibitorok (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) (Besson és mtsai., 2008) és specifikus CDK4 inhibitorok (Canepa és mtsai., 2007) jelenléte egyaránt szabályozza. A pRb különböző kinázok általi foszforilációja eltérő módon befolyásolja a partnermolekulákkal való kölcsönhatást. A Ser780 oldallánc ciklin D/CDK4 komplex általi foszforilációja következtében a pRb-E2F kölcsönhatás felbomlik (Kitagawa és mtsai., 1996), míg a Thr821/826 foszforiláció nincs hatással ezen kölcsönhatásra (Knudsen és Wang, 1996). A Thr826 CDK4 vagy a Thr821 CDK2 általi foszforilációja együtt és külön-külön is megakadályozza az LXCXE motívumot tartalmazó fehérjékkel történő komplexképzést (Zarkowska és Mittnacht, 1997).

A pRb fehérje defoszforilációja teszi lehetővé a mitózisból való kilépést. Defoszforiláció által újra aktiválódik, képes kötődni az E2F transzkripciós faktorhoz, így gátolja annak működését. Membránpermeábilis foszfátáz inhibitorokkal végzett kísérletek a PP1 és PP2A enzimek szerepét feltételezik a pRb defoszforilációjában (Ludlow és mtsai., 1993). A PP2A közvetett módon járul hozzá a pRb szabályozásához, gátlása a ciklin-függő kinázok aktivitásának csökkentése révén befolyásolja a pRb foszforilációs szintjét (Yan és Mumby, 1999). A PP1c és a pRb kölcsönhatására, és a pRb több oldalláncának PP1c általi defoszforilációjára vonatkozóan számos adat található az irodalomban (Tamrakar és mtsai., 1999; Tamrakar és Ludlow, 2000a; Rubin és mtsai., 2001; Wang és mtsai., 2001). Kimutatták, hogy a PP1 α gátlása szükséges a sejtciklus G1/S átmenete során (Liu és mtsai., 1999), míg az aktív PP1 α a sejtciklus leállítását és apoptózist indukál a pRb alulfoszforilált állapotban tartásával (Liu és mtsai., 2006). A PP1c-t a pRb-hez irányító regulátor alegységet azonban még nem azonosították. Nelson és munkatársai kimutatták, hogy bár valamennyi PP1 izoforma képes a pRb defoszforilációját katalizálni, a delta izoforma a leghatékonyabb.

Gélszűréssel elválasztott sejtlizátum pRb-t defoszforiláló frakcióiban a PP1c nagy molekulatömegű asszociátumok formájában van jelen (Nelson és mtsai., 1997). A pRb főképp a sejtmagban lokalizálódik, így a PP1c-vel közös kölcsönható partnerként olyan fehérjék merülhetnek fel, mint a nukleáris protein foszfatáz inhibitor, a NIPP1 (Jagiello és mtsai., 1997), vagy a nukleáris foszfatáz célirányító alegység, a PNUTS (Allen és mtsai., 1998). A MYPT1 regulátor alegység elsősorban a citoplazmában lokalizálódik, de bizonyos sejttípusok esetén a sejtmagban is kimutatható (Murata és mtsai., 1997; Lontay és mtsai., 2004; Lontay és mtsai., 2005). MYPT1-GFP transzfekciója NIH3T3 sejtekbe blokkolja a sejtciklust a G1/S átmenetnél, és apoptotikus sejtpusztulást indukál, feltételezhetően a pRb defoszforilációjának megzavarása révén. A MYPT1-GFP stabil transzfekciója csak HEK293 sejtekben valósítható meg, amelyekben a pRb funkció módosított (Wu és mtsai., 2005). Ezen eredmények alapján feltételezhető a MP szerepe a pRb defoszforilációjában és ezzel a sejtciklus szabályozásában.

Tanninok hatása a protein foszfatázok aktivitására



6. ábra PGG és EGCG szerkezete

A tanninok növényi eredetű polifenolok. Valamennyi tannin közös szerkezeti elemként egy vagy több polihidroxil egységet (ami általában D-glükóz) és a hidroxilokhoz észterkötéssel kapcsolódó fenolos hidroxil-csoportokkal rendelkező gyűrűket (például galluszsav) tartalmaz. Az epigallokatekin-3-gallát (EGCG) a legnagyobb mennyiségben jelenlévő polifenol a zöld teában, és annak daganatellenes hatásáért elsődlegesen felelős.

Az EGCG gátolja a sejtek proliferációját és apoptózist indukál számos daganatos sejtvonalon, míg normál sejtekre nincs hatással (Ahmad és mtsai., 1997). Hatásmechanizmusa nem ismert minden részletében, de irodalmi adatok szerint protein kinázok szabályozása révén fejt ki antiproliferatív hatását. Ide sorolhatók például a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) család tagjai (az Erk1/2, a JNK és a p38), az I κ B kináz, az Akt kinázok és a PKC (Qin és mtsai., 2008). Ezen kinázok aktiválása révén az EGCG fontos jelátviteli útvonalak (AP-1, NF- κ B, PI3K/AKT) szabályozásában vehet részt (Khan és mtsai., 2006). A penta-O-galloil-D-glükóz (PGG) szintén a tanninok modellvegyületének tekinthető és az eddigi vizsgálatok szerint az EGCG-hez részben hasonló biológiai hatásokat fejt ki. Előkísérleteink szerint feltehető, hogy a tannin alkotórészek gátolják a protein foszfatázok aktivitását, azonban ennek részletes vizsgálata mindeddig nem történt meg.

CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi áttekintésből kitűnik, hogy a modell enzimként választott MP szabályozását széleskörűen vizsgálták, ennek ellenére a MYPT1 foszforilációs helyek funkciói még nem minden tekintetben tisztázottak. A Thr850 foszforilációs hely környezetének aminosav szekvenciája például hasonló a Thr695 gátló foszforilációs helyhez, ezért felmerül annak a lehetősége, hogy a Thr850 foszforilációja is gátló hatású lehet. Felvetődik az a kérdés is, hogy az *in vitro* ROK enzimmel foszforilálható Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja hogyan valósul meg simaizom és nem-izom sejtekben fiziológiai effektorok és foszfatázgátlók jelenlétében. Nem ismert továbbá a foszfatázoknak a sejthalálban betöltött szerepe és ezen hatások molekuláris háttere, különösen a regulátor alegység, mint például a MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatásainak és az ezeket befolyásoló foszforilációs folyamatok tekintetében. Korábban kimutattuk (Erdélyi és mtsai., 2005), hogy a gallotannin gátolja a PP1 és PP2A enzimek aktivitását, azonban a gátlás mechanizmusa, a tanninoknak foszfatázokkal való kölcsönhatásának molekuláris részletei, valamint a gátlás típuspecificitása nem ismert.

A felvetett kérdések alapján munkánk fő célkitűzései az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

1. A miozin foszfatáz (MP) MYPT1 alegység Thr850 foszforilációs helyének a MP aktivitásának szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata. A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncai foszforilációjának tanulmányozása sejtekben.
2. A PP1 és PP2A enzimek kalikulin-A-val történő gátlásának szerepe a leukémiás sejtek életképességének szabályozásában, valamint sejthalált indukáló kemoterápiás szerek jelenlétében.
3. A MP és a pRb kölcsönhatásának vizsgálata és a MP szerepének tanulmányozása a pRb foszforilációs szintjének szabályozásában.
4. A tannin alkotórészek modellvegyületeinek tekinthető EGCG és PGG vegyületek PP1c-vel való kölcsönhatásának és a gátló hatás mechanizmusának jellemzése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásból: [γ - 32 P]ATP (Izotóp Intézet Kft, Budapest), CNBr-aktivált Sepharose 4B, SP-Sepharose, MonoQ, Protein-A Sepharose, glutation-Sepharose, nitrocellulóz membrán (0,45 μ m pórusméret) (GE Healthcare); amilóz gyanta (New England Biolabs); teljes mini proteáz inhibitor koktél tabletták (Roche); BCA fehérje meghatározó kit, nagy érzékenységgű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagens (Pierce); Antifade Light Kit, DAPI (Molecular Probes); penicillin/streptomycin oldat, antibiotikum-antimikotikum oldat, L-glutamin oldat, tripszin, borjúsérum (FBS), D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) tápoldat_(Gibco); Y27632 inhibitor, kalikulin-A, DEVD-AMC kaszpáz-3 szubsztrát (Calbiochem); daunorubicin (Pfizer); EGCG, metil-tiazol-tetrazólium, Alamar Blue (Sigma); Kaleidoscope fehérje molekulatömeg standard (Bio-Rad); CM5 szenzor chip, HBS-EP (10 mM Hepes pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P20) puffer, Amin Kapcsolási Kit, GST Kapcsolási Kit (Biacore). Minden más vegyszer a kereskedelmi forgalomban elérhető (Sigma, Reanal) legnagyobb tisztaságú volt.

Antitestek

Az antitesteket a feltüntetett irodalmi hivatkozásokban leírtak szerint alkalmaztuk, vagy kereskedelmi forgalomból szereztük be és a gyártók útmutatásai szerint használtuk: anti-MYPT1¹⁻³⁸ (Wu és mtsai., 2003); anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (Lontay és mtsai., 2004), monoklonális anti-MYPT1^{pT695} (Dr. M. Walsh, University of Calgary), poliklonális anti-MYPT1^{pT695} és anti-MYPT1^{pT850}, anti-PP1c δ (Upstate); anti-PP1 (E9) (Santa Cruz Biotech.); tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl IgG, HRP-konjugált anti-egér IgG, (Sigma); Alexa 488 anti-nyúl IgG és Alexa 543 anti-egér IgG (Molecular Probes).

Fehérjetisztítási eljárások

A foszfatáz aktivitás meghatározáshoz a szubsztrátokat pulyka zúzából származó miozin (Wu és mtsai., 2003) és izolált 20 kDa könnyűlánc foszforilációjával (Erdődi és mtsai., 1995) állítottuk elő. A miozin foszfatáz holoenzimet csirke zúzából tisztítottuk (Shimizu és mtsai., 1994). A natív PP1c-t nyúl vázizomból izoláltuk, a PP2Ac-től heparin-Sepharose oszlopon választottuk el (Gergely és mtsai., 1984), majd FPLC-MonoQ oszlopon

tisztítottuk tovább (Murányi és mtsai., 1998), és szükség esetén MYPT1¹⁻²⁹⁶ immobilizálásával affinitás-kromatográfias lépést is alkalmaztunk (Tóth és mtsai., 2000b).

GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása

A csirke zúza 133 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő MYPT1 (GST-MYPT1), a Thr695Ala (MYPT1^{T695A}), a Thr850Ala (MYPT1^{T850A}) valamint a Ser694Ala, Thr695Ala és Thr850Ala (MYPT1^{AAA}) pontmutációkat tartalmazó teljes MYPT1 és a C-terminális 667-1004 aminosavaknak megfelelő (GST-MYPT1-C) fehérjéket *Escherichia coli* BL-21-star sejtekben, pGEX4T1 expressziós rendszert használva állítottuk elő glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjékként (Feng és mtsai., 1999). Az expressziós rendszereket Dr. Masaaki Ito (Mie University, Japán) bocsátotta rendelkezésünkre. A rekombináns fehérjék expressziója során minden lépést 37°C-on és 100 µg/ml ampicillin antibiotikum jelenlétében végeztünk. Az expresszió első lépéseként a megfelelő plazmidot tartalmazó baktériumokat 1 % agarózt tartalmazó LB (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,2) lemezre szélesztettük és 16-18 óráig tenyésztettük. Az agarlemezről egy különálló telepet 2x5 ml LB tápoldatba oltottunk és 16 óráig rázattuk, majd a felszaporított baktériumokat 1 literre hígítottuk. Ezt a tenyészetet 3-4-órán keresztül rázattuk (OD₆₀₀=0,8-1), és a rekombináns fehérje expressziót 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd további 3 óra inkubálás után a sejteket centrifugálással (20 000 g, 15 perc) gyűjtöttük össze. Az üledéket 2x500 ml PBS-sel (20 mM Na-foszfát (pH 7,2), 115 mM NaCl) mostuk. A GST-MYPT1 és GST-MYPT1^{T695A} fehérjék tisztítására kétlépeses ioncserés kromatográfiát (SP-Sepharose, MonoQ) alkalmaztunk. SP-Sepharose kromatográfia során a GST-MYPT1 fehérjéket elválasztottuk a bakteriális proteázok többségétől. Az 1 liter LB tápoldatnak megfelelő sejtmenyiséget 10 ml homogenizáló pufferben (30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM DTT, 150 mM NaCl, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin és 0,1 mM PMSF) szuszpendáltuk. A sejtek lízisét -80°C-ra történő fagyasztással, majd a felolvasztást követően 3x1 perc szonikálással (Branson 250 Sonifier) segítettük elő. Az oldható frakciót centrifugálással (20 000 g, 20 perc, 4°C) elválasztottuk a sejtörmeléktől, majd puffer-A-val (30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 mM DTT) az eredeti térfogat kétszeresére hígítottuk és SP-Sepharose oszlopra (10 ml) vittük 2 ml/perc átfolyási sebességgel. Az oszlopot 150 mM NaCl-ot tartalmazó puffer-A-val mostuk, majd a GST-MYPT1-et 90 ml 0,15-1 M NaCl gradienssel eluáltuk. A GST-MYPT1-et tartalmazó frakciókat SDS-PAGE-t követő fehérje festéssel (Coomassie Blue) azonosítottuk és összegyűjtöttük (0,45-0,75 M NaCl). Centricon 30 segítségével végrehajtott töményítéssel,

majd azt követő puffercserével az ionerősséget 50 mM NaCl koncentráció alá csökkentettük, és a mintát MonoQ oszlopra (1 ml) vittük fel. Az oszlopot 150 mM NaCl-ot tartalmazó puffer-A-val mostuk, majd a kötődő fehérjék elúcióját 20 ml 0,15-0,6 M NaCl gradienssel (puffer-A-ban) végeztük. A GST-MYPT1-et SDS-PAGE-t követően a fehérje molekulatömege szerint azonosítottuk, amit MYPT1-re specifikus antitesttel végzett Western blottal is megerősítettünk.

A GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ fehérjét glutation-Sepharose 4B affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A fehérje expresszió után 1 liter LB táptalajból összegyűjtött sejteket 20 ml PBS-ben homogenizáltuk proteázgátlók (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF) és 50 µg/ml lizozim jelenlétében. A fehérje tisztítását a lizátum oldható frakciójából végeztük, amelyet a sejtízis (fagyasztás -80°C-ra, 3x1 perc szonikálás) után centrifugálással (20 000 g, 20 perc, 4°C) választottunk el. A GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ -t 1 ml glutation-Sepharose 4B jelenlétében történő inkubálással (12 óra, 4°C) immobilizáltuk. A mátrixot PBS-sel mostuk és a kötődött rekombináns fehérjét 2x1 ml 20 mM glutationt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferrel eluáltuk.

Hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His) expresszált fehérjék előállítás és tisztítása

A MYPT1 rövidített mutánsait (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1¹⁻⁶³³) (Hirano és mtsai., 1997) *Escherichia coli* M15 baktériumban expresszáltuk, pQE32 expressziós vektort használva, az N-terminális véghez kapcsolódó hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His). A baktériumok felszaporítását a GST fúziós fehérjékhez hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben 100 µg/ml ampicillin és 25 µg/ml kanamicin antibiotikumokat használtunk. Az 500 ml LB tápoldatból kinyert baktérium üledéket 10 ml PBS-ben homogenizáltuk proteázgátlók (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM benzamidin, 0,1 mM PMSF) jelenlétében. A His-fehérjék az expresszió során az inklúziós testekbe kerültek. A sejtek lízisét (fagyasztás -80°C-ra, felolvasztás, 3x1 perc szonikálás) követően centrifugálással kapott üledéket 10 ml 1 % Triton X-100 detergenst tartalmazó PBS-sel szuszpendáltuk proteáz inhibitorok jelenlétében. Az inklúziós testeket 10 ml 6 M guanidin-HCl-ot tartalmazó PBS-sel tártuk fel proteázgátlók jelenlétében, majd a fehérjéket Ni-agaróz oszlopra vittük. A bakteriális hisztidin tartalmú fehérjék eltávolítására az oszlopot 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MnCl₂, 0,8 M NaCl és 5 mM imidazol összetételű pufferrel mostuk, amíg a Bradford-módszerrel meghatározott fehérje koncentráció 0,01 mg/ml alá nem csökkent. Az expresszált fehérjéket 10x1 ml 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MnCl₂, 0,2 M

NaCl és 100 mM imidazol összetételű pufferrel eluáltuk. A rekombináns His-PP1c δ tisztítása és renaturálása a korábban leírt módszer szerint történt (Tóth és mtsai., 2000b).

Sejtkultúrák és a sejtek kezelése effektorokkal

A kísérletek egyik részében az American Type Culture Collection (ATCC) cégtől származó humán patkány aorta simaizom (A7r5) sejteket használtunk. Az A7r5 sejtek tenyésztése 37°C-on, 5 % CO₂ és 95 % levegő vízgőzzel telített keverékében történt. A sejtek D-MEM oldatban tartottuk, amely 10 % FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillin/streptomycin-t és 500 U/ml antibiotikum-antimikotikumot tartalmazott.

Az effektorokkal történő kezeléshez a sejteket 70-80 %-os konfluenciáig növesztettük, majd a kezelés előtt 16 órán át szérummentes D-MEM-ben tartottuk a sejtek szinkronizálása és éheztetése céljából. Az A7r5 sejteket 100 nM CL-A (20 perc), 1 μ M LPA (20 perc) vagy 10 μ M Y27632 (30 perc) jelenlétében inkubáltuk. Kombinált kezeléseknél a sejteket 30 percig 10 μ M Y27632-val előinkubáltuk a CL-A vagy a LPA kezeléseket megelőzően. A kezeléseket követően a sejtekhez triklór-ecetsavat adtunk és a csapadékot felkapartuk, centrifugálással összegyűjtöttük, majd háromszori acetonos mosás után a megszártított sejteket SDS-mintapufferben lizáltuk.

A European Collection of Cell Cultures-től (ECACC) származó humán monocita leukémiás sejtvonalat (THP-1) a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A szuszpenziós sejtvonalat 10 % FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillin/streptomycint és 500 U/ml antibiotikum-antimikotikumot tartalmazó IMDM tápfolyadékban tartottuk. A kísérletek során $\sim 10^6$ /ml sejtet 50 nM CL-A-val kezeltük 60 percig, majd további 6 vagy 12 órán át szérummentes médiumban tartottuk őket. A 2 μ g/ml DNR-rel történő kezelést 6 vagy 12 óráig alkalmaztuk önmagában vagy CL-A előkezeléssel kombinálva. Tanninok hatásának vizsgálatára a sejteket 24 órán keresztül 0-100 μ M PGG-vel vagy EGCG-vel inkubáltuk. A kezeléseknél a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, jéghideg PBS-sel mostuk, majd 100 μ l 1 x SDS-mintapufferben (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS, 10 % glicerin, 50 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél) lizáltuk, szonikáltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszóhoz 0,01 % brómfenolkéket adva a mintákat 10 percig 100°C-on főztük, majd Western blottal analizáltuk.

THP-1 sejtek szubcelluláris frakcionálása

A frakcionálás minden lépését 4°C-on, jéghideg oldatokkal végeztük. THP-1 sejteket centrifugáltuk (800 g, 3 perc), majd PBS-sel mostuk. A sejteket 10 mM Hepes (pH 7,9), 10

mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél összetételű pufferben szuszpendáltuk, enyhén kevertettük, majd 15 percig jégen tartottuk. A szuszpenzióhoz 0,5 % végtérfogatban Triton X-100-at adtunk, majd 10 másodpercig óvatosan vortexszel kevertük. A lizátumot centrifugáltuk (15 000 g, 45 másodperc). Az így kapott üledék sejtmagot és sejttörmelékét tartalmazott, a felülúszót pedig citoszol frakcióként használtuk. Az üledéket 20 mM Hepes (pH 7,9), 420 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél összetételű pufferben homogenizáltuk. A szuszpenziót időnként vortexszel keverve 25 percig jégen tartottuk, majd centrifugáltuk (15 000 g, 10 perc). Az így kapott felülúszó a sejtmag kivonatnak felel meg. A citoszol és nukleáris frakciókat immunoblottal vizsgáltuk.

Western blot

A THP-1 sejtekből készített teljes lizátumok fehérje koncentrációjának meghatározásához BCA reagenst használtunk, amelyhez a lizátumokat 1:10 arányban hígítottuk. Standardként BSA-t (marha szérum albumin) használtunk, az oldatok abszorbanciáját 540 nm-en ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével detektáltuk. A fehérjekoncentráció (mg/ml) meghatározásához az abszorbancia adatokat GraphPad Prism software-rel analizáltuk lineáris regressziót alkalmazva. A fehérjemintákat azonos koncentráció eléréséig hígítottuk, majd 2 x SDS-mintapuffert (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS, 20 % glicerin) hozzáadva 100°C-on 5 percig forraltuk.

A THP-1 sejtfehérjéket (50-100 µg) SDS-PAGE módszerrel választottuk el Laemmli (Laemmli, 1970) módszerét alkalmazva 10 % akrilamidot tartalmazó gélen Bio-Rad MiniProtean készüléket használva. A géleket nitrocellulóz membránra blotoltuk BioRad transzfer egységgel 100 V-on 90 percig BioRad hűtőegység alkalmazásával. A membrán blokkolásához 5 % zsírszegény tejport és 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-t használtunk, az első illetve második antitest hígításához pedig 0,1 %-os tejport tartalmazó PBS/Tween 20 oldatot. A blokkolást követően a membránokat mostuk, majd elsődleges antitesttel inkubáltuk szobahőmérsékleten 90 percig vagy 4°C-on éjszakán át. Ezt HRP-konjugált másodlagos antitesttel történő inkubálás követte szobahőmérsékleten, 2 órán át. Az immunreakciókat nagy érzékenységgű kemilumineszcencián alapuló oldattal (ECL) detektáltuk. A foszforilációs helyre specifikus antitestek esetén a PBS puffer helyett minden esetben TBS puffert használtunk, amelyben a foszfátot 25 mM Tris-HCl helyettesítette.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A foszfatáz aktivitásméréseket tisztított natív vagy rekombináns PP1c-vel, PP2Ac-vel, miozin foszfatáz holoenzimmal (MPH) vagy THP-1 sejt-lizátummal végeztük, 3 μM ^{32}P -miozint, 2 μM ^{32}P -MLC20-at vagy 0,5 μM ^{32}P -MBP-pRb-C-t használva szubsztrátként. A foszfatázokat 0,1 % BSA-t és 0,1 % 2-merkaptóetanolt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferrel hígítottuk, majd különböző effektorokkal (tiofoszforilált GST-MYPT1, GST-MYPT1^{T695A}, GST-MYPT1^{T850A}, GST-MYPT1^{AAA}, CPI-17, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest, OA, PGG, EGCG, aleppói tannin, galluszsav) inkubáltuk 10 percig. A reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítottuk és 10 percig 30°C-on inkubáltuk, majd 200 μl 10 % TCA és 200 μl 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kikapódott $^{32}\text{P}_i$ -ot a kicsapódott fehérjék centrifugálással (10 000 g, 1 perc) történő elválasztása után 350 μl felülúszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A foszfatáz aktivitás változását a kontroll mintákhoz hasonlítva (azt 100 %-nak véve) százalékosan adtuk meg.

A CL-A-val és/vagy DNR-rel kezelt THP-1 sejteket módosított RIPA pufferrel (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 és 0,5 % proteáz inhibitor koktél) lizáltuk, majd szonikáltuk és centrifugáltuk az aktivitásmérést megelőzően. A foszfatáz aktivitást 2 μM ^{32}P -MLC20 vagy 0,5 μM ^{32}P -MBP-pRb-C szubsztráttal mértük 30°C-on 1 perc reakcióidővel.

Immunprecipitáció

Protein-A Sepharose-t inkubáltunk poliklonális anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy monoklonális anti-pRb antitesttel immunprecipitációs pufferben (IP puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél) 1-2 óráig 4°C-on, majd az elegyet centrifugáltuk (800 g, 5 perc, 4°C). THP-1 sejtek teljes lizátumát (1000 μl , 7,5-9 mg fehérje) IP pufferben hígítottuk, majd előtisztítottuk 100 μl Protein-A Sepharose-zal 1-2 órán át történő kevertetéssel. Az előtisztított lizátumot anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy anti-pRb antitestekkel kapcsolt Protein-A Sepharose-zal inkubáltuk 6 óráig 4°C-on. Kontrollként nem-immun nyúl (NRS) vagy egér (NMS) szérummal kapcsolt Protein-A Sepharose-t alkalmaztunk. A gyanta szemcséket háromszor IP pufferrel mostuk. Valamennyi mosást követően a folyadékot maradéktalanul eltávolítottuk a gyantáról. A Protein-A Sepharose-t SDS-mintapufferrel inkubáltuk 100°C-on 5 percig, majd a fehérjéket SDS-PAGE-el elválasztottuk, és Western blottal analizáltuk. A fehérjék kimutatásához anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-pRb antitesteket használtunk.

Pull-down vizsgálat C-terminális pRb fragmentummal

A pull-down vizsgálatot maltózkötő fehérjével konjugált C-terminális retinoblasztóma fragmentummal (MBP-pRb-C) végeztük. Amilóz gyantát Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 és 0,5 % proteáz inhibitor koktél összetételű pufferrel ekvibráltuk, majd 400 µl 0,5 µM MBP-pRb-C-vel kapcsoltuk. A gyanta által nem kötött MBP-pRb-C-t a kötődéshez használt pufferrel történő mosásokkal távolítottuk el. A THP-1 lizátumot (~5 mg fehérje) kapcsolatlan amilóz gyantával előtisztítottuk, majd 100 µl kapcsolatlan (kontroll) vagy MBP-pRb-C-vel kapcsolt amilóz gyantával inkubáltuk 1 ml-es térfogatban 4 óráig 4°C-on. A gyantát háromszor mostuk a fenti pufferrel, majd a gyanta által kötött fehérjéket SDS-mintapufferrel történő forralással szolubilizáltuk. A mintákat anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel vizsgáltuk Western blot analízissel.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

Az effektorokkal történő kezelés előtt a THP-1 sejteket 12 óráig szérummentes IMDM-ben tartottuk. A szérum-éheztetett sejteket DNR-rel, CL-A-val vagy CL-A-val és DNR-rel inkubáltuk, és a sejteket citospin centrifugával fedőlemezre centrifugáltuk. A lemezeket jéghideg PBS-sel mostuk, majd 4 % paraformaldehiddel 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk, amelyet ismételt mosás követett PBS-sel. A sejteket 0,05 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel permeabilizáltunk 2 percig szobahőmérsékleten, majd háromszor mostuk PBS-sel. Blokkoláshoz steril, 1 % BSA-t tartalmazó PBS-t használtunk (1 óra, 4°C). Az elsődleges antitesteket 1:50-1:100 arányban 0,1 % BSA/PBS-sel hígítottuk és a fedőlemezeket 6-12 órán át nedves kamrában inkubáltuk. Háromszori PBS-sel történő mosás után Alexa 488-konjugált anti-nyúl IgG-vel (zöld) vagy Alexa 543-konjugált anti-egér IgG-vel (piros) inkubáltuk (1:150 hígítás) 90 percig 4°C-on. A mintákat háromszor 10 percig PBS-ben mostuk, majd a sejtmagok festésére 2,5 µg/ml DAPI-val inkubáltuk. Végül a fedőlemezeket Antifade Light Kit segítségével fedtük le. Az immunfluoreszcenciás jelölést követően a THP-1 sejteket Hélium/Neon (543), Kripton/Argon (488/568) és UV (351/364) lézer detektorokkal felszerelt Zeiss LSM 510 konfokális lézer mikroszkóppal (Zeiss LSM 510; Carl Zeiss), Plan-Neofluar 40x/1,3 nagyítású olaj DIC immerziós objektív lencsével vizsgáltuk 90-175 nm pinhole-t alkalmazva. A digitalizált felvételeket LSM 5 Image Examiner (Carl Zeiss) szoftver program segítségével készítettük el, majd a Photoshop képkészítő szoftvert alkalmaztunk az ábrák készítéséhez (Adobe Systems).

Metil-tiazol-tetrazólium (MTT) teszt

A THP-1 sejteket (1×10^6 /ml) a kezelések előtti 16 órában szérummentes médiumban tartottuk, majd egy órás CL-A kezelés (50 nM) után további 24 órán át inkubáltuk $2 \mu\text{g/ml}$ DNR jelenlétében vagy anélkül. A DNR-t CL-A előkezelés nélkül is alkalmaztuk. A kontroll sejteket 24 óráig tartottuk szérummentes médiumban. A kezelések végén a sejtekhez MTT-t adtunk, amit az élő sejtek színes formazánná alakítottak. A kialakuló szín intenzitását spektrofotométerrel 562 nm-en mértük. Az optikiai denzitás (OD) mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával.

Alamar Blue proliferációs vizsgálat

A THP-1 sejteket (1×10^6 /ml) a kezelések előtt 12 óráig szérummentes IMDM-ben tartottuk, majd 24 órán keresztül 0-100 μM PGG-vel vagy EGCG-vel inkubáltuk. Ezután a médiumhoz 20 μM végkoncentrációban Alamar Blue-t adtunk, majd a fluoreszcenciát 530/590 nm-en mértük.

Kaspáz-3 aktivitás mérése

A kaspáz-3 aktivitást egy szintetikus szubsztrátból, a DEVD-AMC konjugátumból történő AMC felszabadulással mértük fluorimetriás módszert alkalmazva. 5×10^6 THP-1 sejtet inkubáltunk effektorok nélkül, $2 \mu\text{g/ml}$ DNR-rel (6 óra), 50 nM CL-A-val (1 óra), vagy CL-A-val és DNR-rel (1 + 6 óra). A sejteket eppendorf csövekbe gyűjtöttük, PBS-sel mostuk, majd 220 μl lízis puffer (10 mM Hepes pH 7,4; 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 1 mM PMSF, 5 mM DTT and 0,5 % proteáz inhibitor koktél) hozzáadása után 10 percig jégen tartottuk. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz (200 μl) $2 \mu\text{g/ml}$ DEVD-AMC szubsztrátot tartalmazó 2x reakció-puffert (100 mM Hepes (pH 7,25), 20 % szacharóz, 0,1 % CHAPS, 5 mM DTT) adtunk. A mintákat 60 percig 37°C -on inkubáltuk, majd a fluoreszcenciát 355/460 nm-en mértük.

Felületi plazmon rezonancia

A pRb és PP1c vagy MYPT1 mutánsok között kialakuló kölcsönhatást felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel vizsgáltuk Biacore 3000 készülékkel. A karboxi-metil dextrán típusú CM5 szenzor chip felületére anti-GST antitestet kötöttünk a fehérje aminos csoportjainak kapcsolásával. A felület előkészítése és a mérések kivitelezése során egyaránt 10 $\mu\text{l/perc}$ áramlási sebességet alkalmaztunk. A chip felületét 200 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbiimid és 50 mM N-hidroxi-szukcinimid összetételű oldat

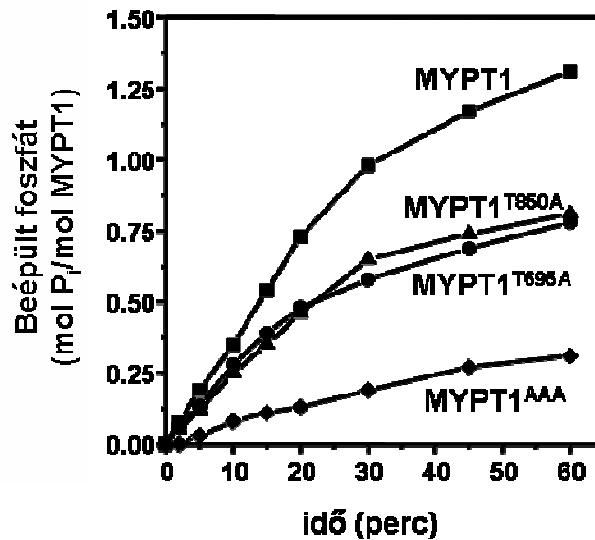
injektálásával aktiváltuk. Az aktivált felületre 30 µg/ml anti-GST antitestet injektáltunk 10 mM Na-acetát (pH 5,0) pufferben 7 percig. A megmaradó reaktív csoportokat ezután 70 µl 1 M etanolamin (pH 8,5) injektálásával blokkoltuk. Egy chip négy különálló felületet (cellát) tartalmaz, ebből három felszínen a rekombináns GST-t, a teljes hosszúságú GST-MYPT1-et, illetve a C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴-et immobilizáltunk 10 mM Hepes (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA és 0,005 % Surfactant P20 összetételű pufferben, míg a negyedik felszín üresen hagyva kontrollként használtuk. A kötődött fehérjék és peptidek mennyiségét a rezonancia jel (RU) növekedésének mértékéből határoztuk meg. 1000 RU megfelel 1 ng fehérje immobilizálásának, ami 6 mg/ml felületi fehérjekoncentrációt jelent (Tóth és mtsai., 2000b). A pRb-MYPT1 kölcsönhatás kinetikai paramétereinek (asszociációs és disszociációs állandók) meghatározására MBP-pRb-C-t 0,5 µM, 1 µM, és 2 µM koncentrációban, az immobilizált fehérjék feloldására használt pufferben injektáltunk a felszínre. A kísérletek során a fehérjék asszociációját 420 másodpercig követtük, a disszociációs fázisban pedig a kötődő fehérje nélküli puffert injektáltunk 360-420 másodpercig. A MBP-pRb-C kötődését az immobilizált fehérjékhez a jel (RU) növekedéseként regisztráltuk az idő (s) függvényében, és az így kapott görbéket (szenzogrammok) analizáltuk. A kontroll felszínen (etanolammal blokkolt felület) kapott jelet kivontuk a fehérjével borított felszíneken kapott kötődési értékekből. A maltózkötő fehérje kötődését szintén ellenőriztük 2 µM MBP injektálásával. A fehérje injektálása után a felszíneket 10 mM glicin-HCl (pH 2,1) oldattal regeneráltuk. Az N-terminális His-MYPT1¹⁻⁶³³-at a CM5 chip felületére közvetlenül, a fehérje szabad aminos csoportjain keresztül immobilizáltuk a fent leírt kapcsolási reakcióval. A pRb-PP1c kölcsönhatás vizsgálatára MBP-pRb-C fragmentumot immobilizáltunk a CM5 chip felületére (amino-csoporton keresztül), majd 0,1 µM, 0,2 µM és 0,5 µM koncentrációban PP1c-t injektáltunk a felszínre, illetve 0,2 µM PP1c-t 0,2 µM MYPT1¹⁻³⁸ peptiddel együtt injektálva is elvégeztük a kísérletet. A tannin alkotórészek és a PP1c kölcsönhatásának vizsgálatára rPP1c δ -t immobilizáltunk a chip felszínére. Az aktív centrumon keresztüli kapcsolódás elkerülésére 5 µM OA jelenlétében végeztük az immobilizálást. A felületre 1-50 µM koncentrációban PGG-t vagy EGCG-t injektáltunk, majd a disszociációs szakasz után a felszíneket 1 M etanolammal (pH 8,5) regeneráltuk. Kompetíciós kísérletek során a PP1c δ -val borított felületet 1 µM MC-LR-rel vagy 5 µM OA-val telítettük, majd 10 µM PGG-t vagy 5 µM EGCG-t injektáltunk. Az OA-val telített felületre a PGG-vel illetve az EGCG-vel együttesen OA-t is injektáltunk. A szenzogramok kiértékelését a BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK

A miozin foszfatáz szabályozó alegység Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja

Vad típusú és mutáns MYPT1 fehérjék foszforilációja

A ROK enzim a MYPT1 regulátor alegységet két fő helyen, a Thr695 és Thr850 oldalláncokon foszforilálja. Korábban kimutatták, hogy a Thr695 foszforilációja a MP gátlását eredményezi, a Thr850 foszforilációjának sebességéről, illetve a foszforiláció gátló hatásáról azonban nincs adatunk. Ezen két oldallánc foszforilációs sebességének összehasonlítása céljából glutation-S-transzferázzal (GST) fuzionált vad típusú (MYPT1) és mutáns (MYPT1^{T695A}, MYPT1^{T850A} és MYPT1^{AAA}) fehérjéket foszforiláltunk radioaktív ATP jelenlétében, és mértük a ³²P-foszfat-beépülés mértékét. A MYPT1^{T695A} és MYPT1^{T850A} fehérjékben a Thr695 illetve Thr850 aminosavak alaninnal vannak helyettesítve, míg a tripla mutáns esetében (MYPT1^{AAA}) a Thr695 és Thr850 foszforilációs helyeken kívül a Ser694 (PKA foszforilációs hely) is alaninra van cserélve.

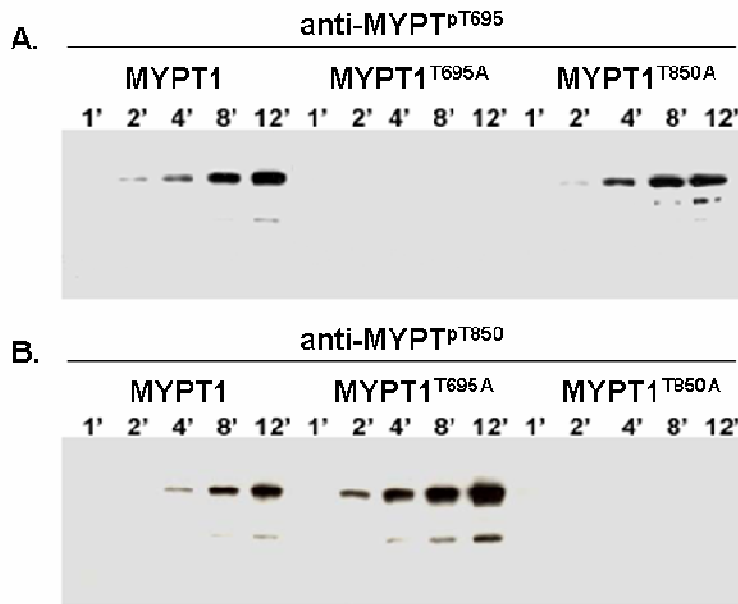


7. ábra MYPT1 mutáns fehérjék ROK általi foszforilációjának sztöchiometriája

A 7. ábrán látható eredményeink azt mutatják, hogy a Thr695 és Thr850 oldalláncokat a ROK azonos mértékben és azonos sebességgel foszforilálja. A maximálisan beépült foszfát mennyisége egy óra foszforiláció után 0,75 mol P_i/mol. A vad típusú, mindkét foszforilációs helyet tartalmazó MYPT1 foszforilációja némileg nagyobb sebességgel és a várakozásoknak megfelelően nagyobb mértékben (1,3 mol P_i/mol) játszódtott le. Kismértékben (0,25 mol

P_i /mol) a tripla mutáns is foszforilálódott, ami a Thr695 és Thr850 oldalláncokon kívüli egyéb ROK foszforilációs hely(ek) jelenlétére utal.

A megfelelő oldalláncok foszforilációját foszfospecifikus antitestek alkalmazásával is bizonyítottuk (8. ábra). A Thr695 oldallánc foszforilált formáját tartalmazó MYPT1-re specifikus antitest (anti-MYPT1^{pT695}) segítségével kimutattuk ezen oldallánc foszforilációját a vad típusú és a Thr850Ala mutációt hordozó MYPT1 esetén (8. A. ábra). A MYPT1^{T695A} fehérje nem adott pozitív jelet ezzel az antitesttel. A Thr850 oldallánc foszforilációja detektálható volt az anti-MYPT1^{pT850} antitesttel MYPT1 és MYPT1^{T695A} foszforilációja esetén, de nem volt kimutatható a MYPT1^{T850A} fehérjénél (8. B. ábra). A blotok azt is mutatják, hogy adott időpontban a foszforilált Thr695 illetve Thr850 aránya magasabb a mutánsokban, mint a vad típusú fehérjében.



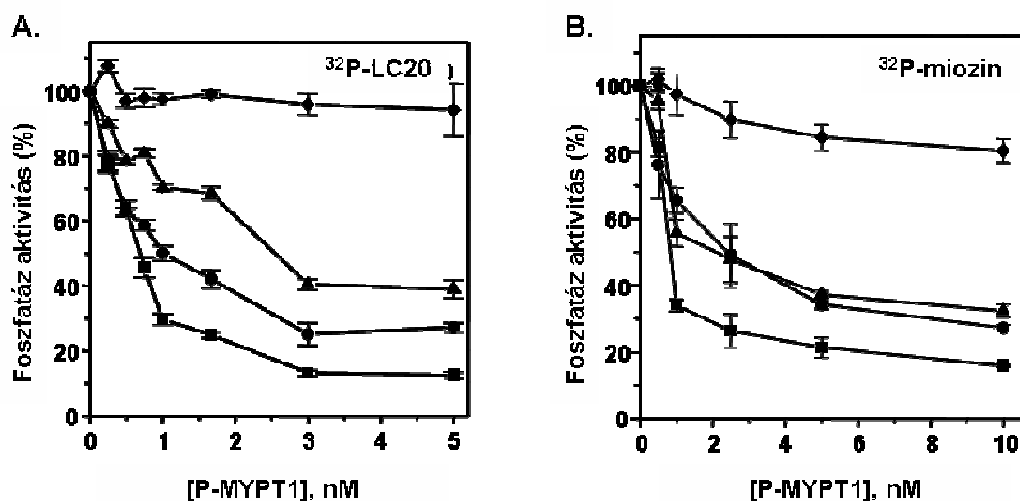
8. ábra **MYPT1 mutánsok foszforilációja Rho-kinázzal**

A vad típusú és mutáns MYPT1 fehérjék foszforilációs közegéből különböző időpontokban vett minták Western blot analizisével ellenőriztük a ROK foszforilációs helyek foszforilációját anti-MYPT1^{pT695} (A) és anti-MYPT1^{pT850} (B) antitestekkel.

Mindezen eredmények arra utalnak, hogy mind a Thr695, mind a Thr850 oldalláncok foszforilálhatóak ROK által, és foszforilációjuk sebessége nem különböztethető meg *in vitro* körülmények között.

A Thr695 és Thr850 foszforilációs helyek hatása a miozin foszfatáz aktivitásra

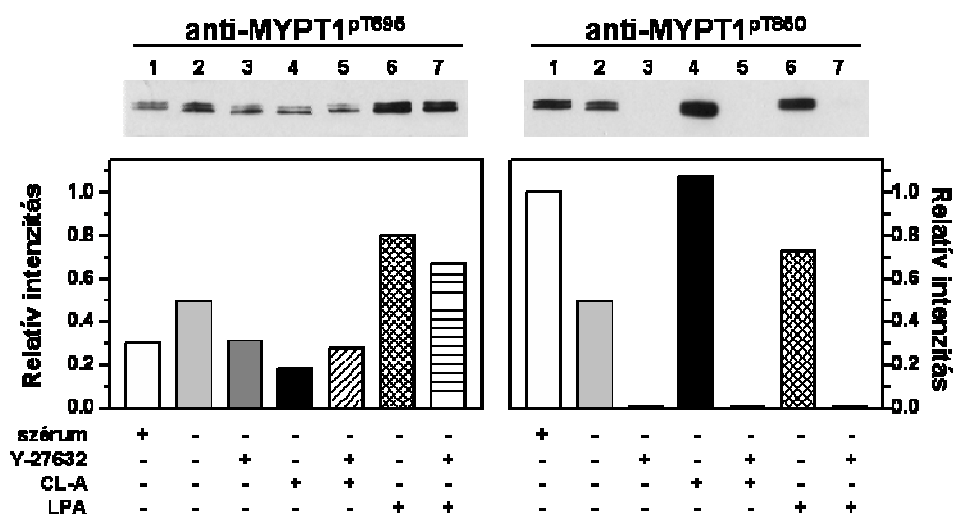
Foszforilált miozin és miozin könnyűlánc szubsztrátok alkalmazásával vizsgáltuk a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncon történő foszforilációjának hatását a natív PP1c aktivitására. A vad típusú MYPT1-et, valamint a három mutáns fehérjét, a MYPT1^{T695A}-t, a MYPT1^{T850A}-t és MYPT1^{AAA}-t tiofoszforiláltuk ROK-zal ATP γ S jelenlétében. A PP1c-t a tiofoszforilált fehérjékkel előinkubálva ³²P-miozin és ³²P-LC20 szubsztrátokkal mértük az enzim aktivitását (9. ábra). ³²P-LC20 szubsztráttal vizsgálva a MYPT1^{AAA} nem befolyásolta a foszfatáz aktivitást, míg a vad típusú MYPT1, valamint a MYPT1^{T695A} és a MYPT1^{T850A} gátló hatású volt. A legnagyobb mértékű enzimaktivitás-csökkenést a vad típusú MYPT1 okozta, míg a mutánsok közül a MYPT1^{T695A} mutatkozott hatékonyabbnak. Hasonló eredményt szolgáltatnak a ³²P-miozin szubsztráttal végrehajtott enzimaktivitás-mérések. A vad típusú MYPT1 jól gátolta a PP1c aktivitását miozin szubsztráttal. A MYPT1^{T695A} és MYPT1^{T850A} a vad típusútól kisebb, közel azonos mértékű gátlást eredményezett. A tripla mutáns a várakozásnak megfelelően alig befolyásolta a PP1c aktivitást. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncon foszforilációja egyaránt gátolja a natív PP1c aktivitását, és ez a gátló hatás az enzim fiziológiai szubsztrátjával, a foszforilált teljes miozinnal is jól detektálható.



9. ábra MYPT1 mutánsok tiofoszforilációjának hatása a natív PP1c aktivitására
PP1c katalitikus alegységet inkubáltunk tiofoszforilált MYPT1 (■), MYPT1^{T695A} (●), MYPT1^{T850A} (▲) és MYPT1^{AAA} (◆) jelenlétében 30°C-on, majd mértük az aktivitását ³²P-MLC20 (A) és ³²P-miozin (B) szubsztráttal. A PP1c aktivitását a MYPT1 mutánsok távollétében tekintettük 100%-nak.

A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja A7r5 simaizom sejtekben

Megvizsgáltuk a MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek lehetséges foszforilációját A7r5 simaizom sejtekben. A ROK szerepére a foszforilációban a RhoA/ROK útvonalat aktiváló lizofoszfátidsav (LPA) és ROK inhibitor (Y27632) alkalmazásával kívántunk adatokat nyerni, valamint foszforilációt foszfátázgátló toxinnal (CL-A) is indukáltunk. Western blot módszerrel, anti-MYPT1, anti-MYPT1^{pT695} és anti-MYPT1^{pT850} antitesteket alkalmazva tanulmányoztuk a kezelések hatását a MYPT1 foszforilációjára.



10. ábra MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek foszforilációja A7r5 simaizom sejtekben

A MYPT1 foszforilációját a Thr695 és Thr850 oldalláncokon anti-MYPT1^{pT695} és anti-MYPT1^{pT850} antitestekkel mutattuk ki.

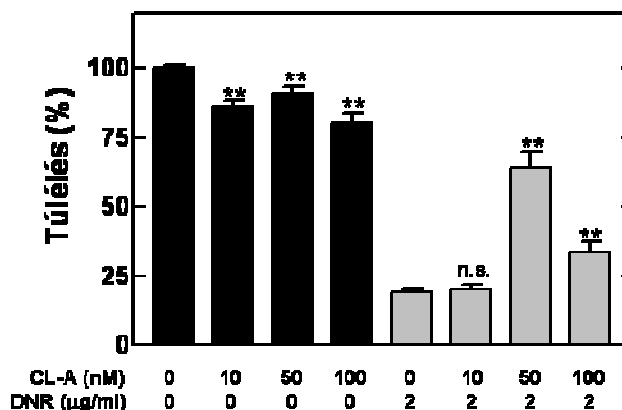
Kontroll sejtekben (mind szérum jelenlétében, mind annak megvonása esetén) a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilált formában vannak jelen (10. ábra 1. és 2. sávok). Kettős sávok detektálása arra utal, hogy a MYPT1 többféle izoformája expresszálódik az A7r5 sejtekben. A szérum-éheztetés eltérő módon befolyásolja a két treonin oldallánc foszforilációját: míg a Thr695 oldallánc foszforilációja kismértékben emelkedik, a Thr850 részlegesen defoszforilálódik szérummentes tápoldatban tartott sejtek esetén. A Rho-kinázt gátló Y27632 inhibitorral kezelt sejtekben a Thr850 oldallánc nem foszforilálódik, míg a Thr695 foszforilációja csak kismértékben csökken (10. ábra 3. sáv). A foszfátázgátlószer CL-A alkalmazása jelentősen növelte a Thr850 oldallánc foszforilációját, de alig volt hatással a Thr695 foszforiláció mértékére (10. ábra 4. sáv). CL-A jelenlétében is csak a Thr850 oldallánc foszforilációs szintje mutatkozott érzékenynek a Rho-kináz gátlószerrel történő kezelésre (10. ábra 5. sáv), ami arra utal, hogy ezen oldallánc foszforilációja ROK-függő, míg

a Thr695 foszforilációjában valószínűleg nem a ROK játssza az elsődleges szerepet. LPA kezelés alkalmazásakor mind a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja jelentősen megemelkedett (10. ábra 6. sáv), ugyanakkor az Y27632 előkezelés csak a Thr850 foszforilációját gátolta jelentősen, a Thr695 oldallánc esetén csak kisebb mértékű csökkenést okozott a foszforilációs szintben (10. ábra 7. sáv). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncai egyaránt foszforilálódnak A7r5 sejtekben. A Thr850 oldallánc az elsődleges foszforilációs hely a ROK enzim számára, míg a Thr695 foszforilációjáért feltehetően más kinázok felelősek.

A PP1 és PP2A enzimek gátlásának szerepe leukémiás sejtek életképességének szabályozásában

CL-A hatása a DNR-rel kezelt THP-1 sejtek túlélésére

A PP1 és PP2A membránpermeábilis toxinokkal történő gátlásának hatása a sejtek életképességére ellentmondásos, mivel a sejtípustól és a kísérleti körülményektől függően mind apoptózis indukcióját (Inomata és mtsai., 1995; Morimoto és mtsai., 1997), mind túlélés fokozódását megfigyelték (Baxter és Lavin, 1992; Xin és Deng, 2006). Ezen folyamatok további vizsgálata céljából THP-1 leukémiás sejtekben tanulmányoztuk foszfatáz inhibitorok szerepét a sejtek túlélésében.



11. ábra CL-A hatása THP-1 sejtek túlélésére DNR jelenlétében és távollétében

THP-1 sejteket kezeltünk 0, 10, 50, és 100 nM CL-A-val 60 percig, majd további 24 órán át inkubáltuk őket 2 µg/ml DNR jelenlétében (szürke oszlopok) vagy anélkül (fekete oszlopok). A sejtek életképességét MTT-módszerrel mértük az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A CL-A-val kezelt THP-1 sejtek túlélését a kezeletlen kontroll sejtekhez hasonlítottuk, míg a CL-A túlélést fokozó hatását a csak DNR-rel kezelt kontrollhoz viszonyítottuk.

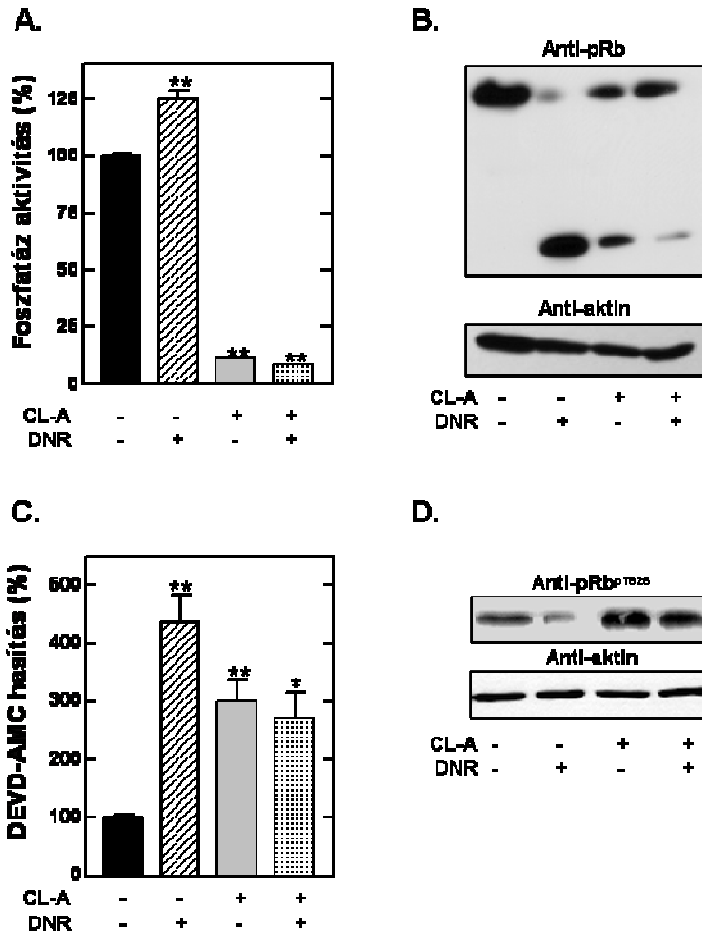
A sejteket 10-100 nM CL-A-val 60 percig kezeltük, majd médiumcsere után további 24 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on. A 11. ábrán bemutatott eredmények szerint a CL-A

önmagában kismértékű, de szignifikáns csökkenést okozott az élő sejtek számában. Ha a sejteket citotoxikus hatású daunorubicinnel (DNR) kezeltük (2 µg/ml, 24 h), azok életképessége nagymértékben csökkent. Ha a DNR kezelést megelőzően a sejteket különböző koncentrációban CL-A-val kezeltük, a sejtek túlélése 50-100 nM CL-A jelenlétében fokozódott. A CL-A védőhatása a DNR által kiváltott sejthalállal szemben 50 nM koncentrációnál bizonyult a leghatékonyabbnak, ezért a további kísérletek során ebben a koncentrációban alkalmaztuk.

CL-A és DNR hatása a foszfatáz aktivitásra, valamint a pRb fehérje foszforilációjára és degradációjára

³²P-MLC20 szubsztrát segítségével minimálisan (háromszorosra) hígított THP-1 lizátum foszfatáz aktivitását mértük CL-A és DNR kezeléseket követően (12. A. ábra). A reakcióidőt (0,5-1 perc) úgy állítottuk be, hogy a maximális szubsztrát átalakulás kb. 30% legyen. A DNR-kezelés kismértékben, de szignifikánsan növelte a THP-1 sejtek foszfatáz aktivitást, míg 50 nM CL-A a kezeletlen sejtekhez viszonyítva mintegy 85 %-kal csökkentette a foszfatáz aktivitást a ³²P-MLC20 szubsztráttal DNR jelenlétében és távollétében egyaránt. Irodalmi adatokból ismert, hogy a leukémiás sejtek kemoterápiás szerekkel indukált apoptózisát a pRb fehérje degradációja kíséri, ami a kaszpáz-3 enzim aktivációjának következménye (Wang és mtsai., 2001). A THP-1 sejtek 12 órás DNR-rel történő kezelése a pRb fehérje degradációját váltotta ki, a Western blotokon a 110 kDa pRb sáv csökkenése és egy 33 kDa méretű fragmentum megjelenése látható. A degradáció mértéke azonban jelentősen csökkent a CL-A-val történő előkezelés következtében (12. B. ábra). A pRb degradációjának mértékét a kaszpáz-3 aktivációja és a pRb foszforilációjának foka határozza meg, ezért vizsgáltuk, hogy a CL-A és DNR befolyásolja-e a kaszpáz-3 aktivitást THP-1 sejtekben. A sejteket 50 nM CL-A-val (1 óra) és/vagy 2 µg/ml DNR-rel (6 h) kezeltük, majd a lizátumokhoz DEVD-AMC szubsztrátot adtunk, és meghatároztuk a kihalított AMC mennyiségét. A DNR-kezelés közelítőleg négyszeresére emelte a THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitását (12. C. ábra). A CL-A önmagában is növelte a kaszpáz-3 aktivitást, azonban a CL-A előkezelés részlegesen kivédte a DNR által indukált kaszpáz-3 aktivációt. A foszfatáz aktivitás változásának megfelelően módosul a pRb fehérje foszforilációja a Thr826 oldalláncon, ahogyan azt a foszfospecifikus antitesttel végzett Western blot vizsgálatok alátámasztják (12. D. ábra, felső sáv). A Thr826 oldalláncot ciklin D/CDK4 kináz komplexe foszforilálja (Zarkowska és mtsai., 1997), míg defoszforilációját a PP1c katalizálja (Rubin és mtsai., 2001). Kezeletlen THP-1 sejtekben a Thr826 oldallánc már részleges foszforilált, míg

DNR kezelés hatására csaknem teljesen defoszforilálódik. CL-A jelenléte (önmagában vagy DNR-rel együtt alkalmazva egyaránt) a kezeletlen sejtekben meglévő foszforilációs szinthez képest fokozta az oldallánc foszforilációját. A minták fehérjetartalmának összehasonlítására aktin kontrollt alkalmaztunk (12. D. ábra, alsó sáv).



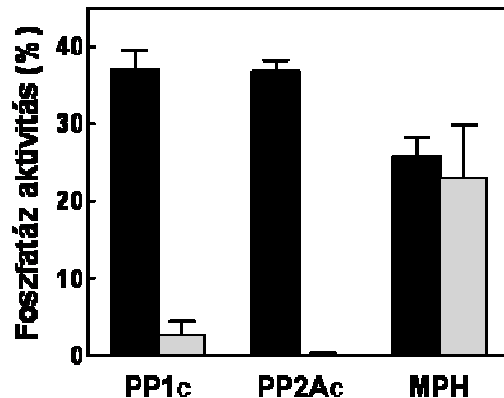
12. ábra CL-A és DNR kezelés hatása THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitására, foszfatáz aktivitására, valamint a pRb fehérje degradációjára és foszforilációjára

THP-1 sejteket 50 nM CL-A-val (egy óra) és/vagy 2 µg/ml DNR-rel (6 (A, C, D) és 12 (B) óra) kezeltünk, majd a lizátumokat különböző módszerekkel analizáltuk. A: THP-1 sejtek foszfatáz aktivitása. A minimálisan (háromszorosra) hígított THP-1 lizátum foszfatáz aktivitását ³²P-MLC20 szubsztráttal mértük 30 másodperces inkubációs időket alkalmazva. A kontroll lizátum foszfatáz aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: *p<0,05; **p<0,01. B: pRb degradációja. CL-A-val történő előkezelés után a THP-1 sejteket további 12 órán át inkubáltuk önmagukban vagy DNR-rel együtt, majd a foltárt mintákat Western bloton anti-pRb és anti-aktin antitestekkel analizáltuk. C: Kaszpáz-3 aktivitás. A THP-1 sejtek lizátumát 2 µg/ml DEVD-AMC szubsztráttal inkubáltuk. A kezeletlen THP-1 sejtek DEVD-AMC hasítási értékét tekintettük 100 %-os kaszpáz-3 aktivitásnak. Szignifikáns változások: *p<0,05; **p<0,01. D: 50 nM CL-A (egy óra) és/vagy 2 µg/ml DNR (6 óra) hatását vizsgáltuk a pRb foszforilációjára anti-pRb^{T826} antitesttel. A géltre felvitt fehérjemennyiségek összehasonlítására aktin kontrollt használtunk.

A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációs szintjének szabályozásában

A MYPT1 célirányító funkciója a pRb fehérje defoszforilációjában

Sejtek kezelése során 50 nM CL-A elsősorban a PP2A katalitikus aktivitását gátolja, a PP1 aktivitását nem befolyásolja (Favre és mtsai., 1997; Yan és mtsai., 1999). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a retinoblasztóma fehérje foszforilált oldalláncait elsődlegesen PP1c izoformák (Rubin és mtsai., 2001) és PP1c katalitikus alegységet tartalmazó holoenzimek (Nelson és mtsai., 1997) defoszforilálják, a PP2A csak a ciklin-függő kinázok aktivitásának befolyásolása révén, közvetve vesz részt a pRb foszforilációs szintjének szabályozásában (Yan és mtsai., 1999), illetve a PP2A a pRb defoszforilációját csak a $[Ca^{2+}]_i$ növekedése esetén fejtheti ki (Magenta és mtsai., 2008). A PP1 holoenzimekben azonban a regulátor fehérjék azonosítására nem került sor. Felvetődött ugyanakkor, hogy a pRb defoszforilációjában a miozin foszfatáz és annak MYPT1 alegysége is szerepet játszhat (Wu és mtsai., 2005), ezért vizsgálataink erre a kérdésre is irányultak.

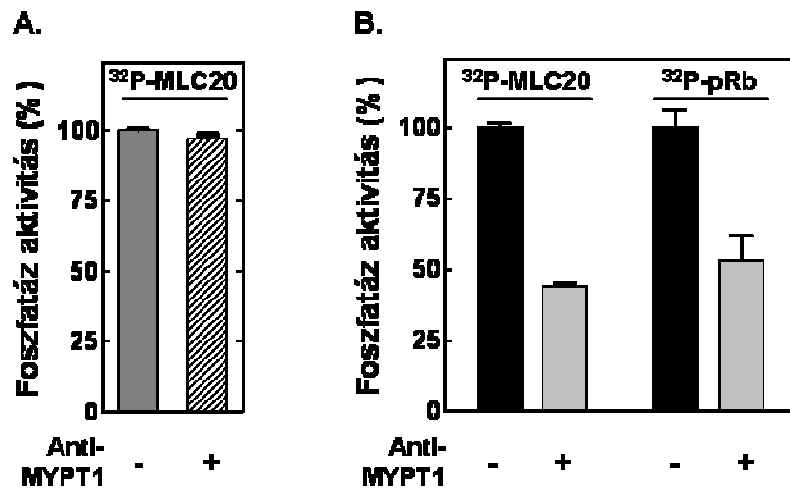


13. ábra ^{32}P -MLC20 és ^{32}P -pRb szubsztrátok defoszforilációja PP1c, PP2Ac és MPH enzimekkel 2 μM ^{32}P -MLC20 (fekete oszlopok) és 0,5 μM ^{32}P -pRb (szürke oszlopok) szubsztrátokból PP1c (1,25 $\mu g/ml$), PP2Ac (3 $\mu g/ml$) és MPH (0,3 $\mu g/ml$) által kihatított $^{32}P_i$ mennyiségét határoztuk meg a szubsztrátok teljes ^{32}P -tartalmának százalékában.

A különböző foszfatáz típusoknak a pRb fehérje defoszforilációjában játszott szerepének vizsgálatára *in vitro* foszfatáz aktivitásméréseket végeztünk tisztított PP1c és PP2Ac katalitikus alegységekkel, valamint miozin foszfatáz holoenzimmel (MPH). A mérésekhez szubsztrátként ciklin D/CDK4 kinázzal ^{32}P -ATP jelenlétében foszforilált MBP-pRb-C fragmentumot alkalmaztuk. Kontrollként ^{32}P -MLC20 szubsztráttal is elvégeztük a defoszforilációs méréseket. A foszfatáz enzimek koncentrációját úgy választottuk meg, hogy

azok a ^{32}P -MLC20 szubsztrátot közelítőleg azonos mértékben (25-35 %) defoszforilálják. A 13. ábrán látható, hogy ezen enzimekoncentrációk mellett a ^{32}P -pRb szubsztrát kis hatékonysággal defoszforilálódott PP1c (2,6 %) által, míg a PP2Ac enzim teljesen hatástalan volt. Ugyanakkor a MPH holoenzim mindkét szubsztrátot hasonló mértékben defoszforilálta (26 % ^{32}P -MLC20 és 23 % ^{32}P -pRb szubsztrát esetén). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PP1c a MYPT1 regulátor alegységgel komplexet alkotva sokkal hatékonyabban képes defoszforilálni a ^{32}P -pRb szubsztrátot, mint a katalitikus alegység önmagában.

A MYPT1 fehérjének a defoszforilációs folyamatban betöltött aktiváló szerepének igazolására a MYPT1 N-terminális része ellen termelt gátló hatású antitesttel (anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶) végeztünk kísérleteket. Irodalmi adatok (Totsukawa és mtsai., 2000) és saját kísérleteink szerint az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest befolyásolja a MYPT1 regulátor funkcióját, és gátolja a MLC20 MPH általi defoszforilációját. Az antitest ugyanakkor nincs hatással PP1c aktivitására ^{32}P -MLC20 szubsztráttal (14. A. ábra).

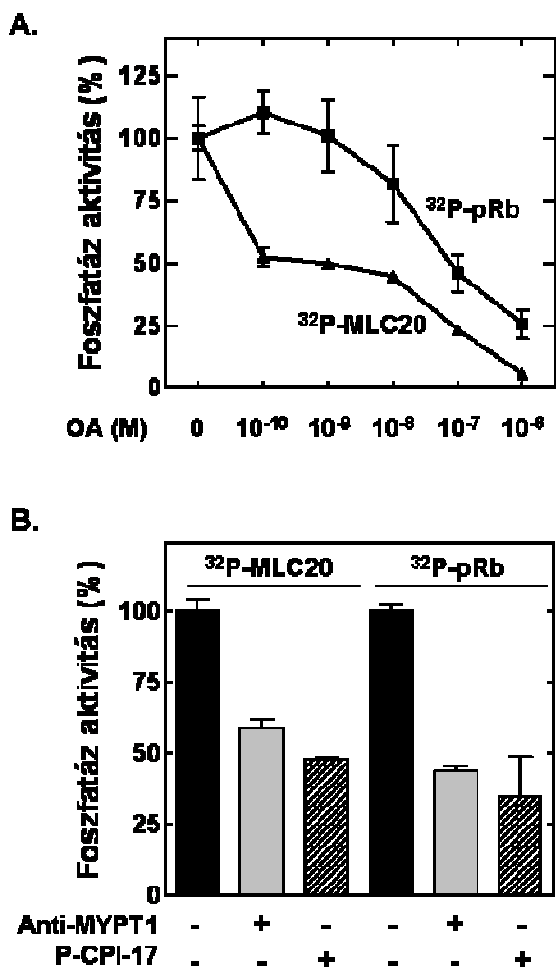


14. ábra Anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest hatása PP1c és MPH foszfataz aktivitására

PP1c katalitikus alegységet (A) illetve tisztított MPH enzimet (B) anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel (0,1 mg/ml) inkubáltuk 30°C-on, majd mértük a foszfataz aktivitást a ^{32}P -MLC20 és ^{32}P -pRb szubsztrátokkal. A foszfatazoknak az antitest távollétében mért enzimaktivitását tekintettük 100 %-nak.

Anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel (0,1 mg/ml) történő előinkubálás után csökkent a MPH aktivitása ^{32}P -MLC20 szubsztráttal, feltehetőleg a holoenzim disszociációja következtében. Az antitest jelenléte gátolja a ^{32}P -pRb szubsztrát MPH általi defoszforilációját is, a gátló hatás mértéke pedig hasonló a MLC20 szubsztráttal kapott értékhez (14. B. ábra). A MYPT1 tehát szerepet játszik a pRb defoszforilációjában a PP1c célirányítása és katalitikus aktivitásának növelése révén.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen mértékben járulnak hozzá a ^{32}P -pRb defoszforilációjához a PP1- illetve PP2A-típusú foszfatáz holoenzimek THP-1 sejtek lizátumában, valamint a pRb-C foszfatáz aktivitás mekkora hányadáért felelős a PP1-MYPT1 komplex.



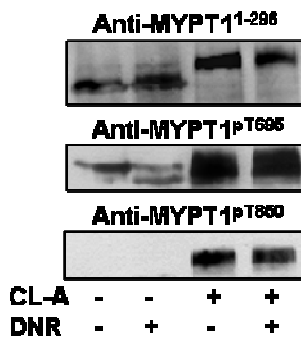
15. ábra THP-1 sejtek lizátumának MLC20 és pRb-C foszfatáz aktivitása

A: OA hatása THP-1 sejtek foszfatáz aktivitására. THP-1 sejtek lizátumát 0,1-1000 nM OA jelenlétében inkubáltuk 5 percig, majd mértük a ^{32}P -MLC20 és ^{32}P -pRb szubsztrátokból felszabaduló $^{32}\text{P}_i$ mennyiségét. B: MP aktivitás THP-1 lizátumban. THP-1 sejtek lizátumát 0,1 mg/ml anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel vagy 3 μM tiofoszforilált CPI-17-tel inkubáltuk, majd a ^{32}P -MLC20 és ^{32}P -pRb szubsztrátokkal meghatároztuk a foszfatáz aktivitást. Az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest illetve CPI-17 távollétében mért foszfatáz aktivitást tekintettük 100 %-nak.

A PP1 és PP2A aktivitás elkülönítésére különböző okadánsav (OA) (0,1-1000 nM) koncentrációk mellett mértük THP-1 sejtek lizátumának foszfatáz aktivitását ^{32}P -MLC20 és ^{32}P -pRb szubsztrátokat alkalmazva (15. A. ábra). A pRb-C foszfatáz aktivitás csak 10-1000 nM OA koncentráció esetén csökkent jelentősen, ami arra utal, hogy a PP1-típusú foszfatáz holoenzimek elsődleges szerepet játszanak a pRb defoszforilációjában THP-1 sejtekben.

Ezzel szemben a lizátum aktivitása ^{32}P -MLC20 szubsztráttal már 0,1-10 nM OA koncentrációnál jelentősen gátlódott, és tovább csökkent 100-1000 nM OA jelenlétében. Az utóbbi eredmény megfelel a korábbi megfigyeléseknek, miszerint a ^{32}P -MLC20 defoszforilációjában a sejt-lizátumok PP1 és a PP2A holoenzimei egyaránt részt vesznek (Lontay és mtsai., 2004).

A MP aktivitásának a lizátum teljes foszfatáz aktivitásához viszonyított részarányának meghatározásához tiofoszforilált CPI-17-et alkalmaztunk. A CPI-17 specifikusan gátolja a MP holoenzimet, míg más PP1 holoenzimek aktivitására nincs hatással. Tiofoszforilált CPI-17-nel (3 μM) történő inkubálást követően a lizátum foszfatáz aktivitása mind ^{32}P -MLC20, mind ^{32}P -pRb szubsztráttal több mint 50 %-kal csökkent a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy THP-1 sejtekben a pRb-foszfatáz aktivitás több mint fele a MP-nek tulajdonítható. Az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest gátolta a lizátum foszfatáz aktivitását is, megerősítve azt a feltételezésünket, hogy a MYPT1 a PP1c-t a foszforilált pRb-hez irányítja, és a PP1c aktivitását növelve elősegíti a defoszforilációs folyamatot. A MPH és THP-1 sejtek lizátumának specifikus aktivitása a ^{32}P -pRb szubsztráttal (MPH: $0,0675 \pm 0,016 \mu\text{mol } ^{32}\text{P}_i \text{ perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$, lizátum: $84 \pm 14 \text{ pmol } ^{32}\text{P}_i \text{ perc}^{-1} \text{mg}^{-1}$) mintegy 2,5-3-szor alacsonyabb, mint a ^{32}P -MLC20 szubsztráttal. Ez a szubsztrátspecifitásban mutatkozó kismértékű eltérés azonban nem zárja ki, hogy a MP fiziológiai körülmények mellett szerepet játszik a pRb foszforilációs szintjének szabályozásában.



16. ábra MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek foszforilációja THP-1 sejtekben CL-A és DNR kezelést követően

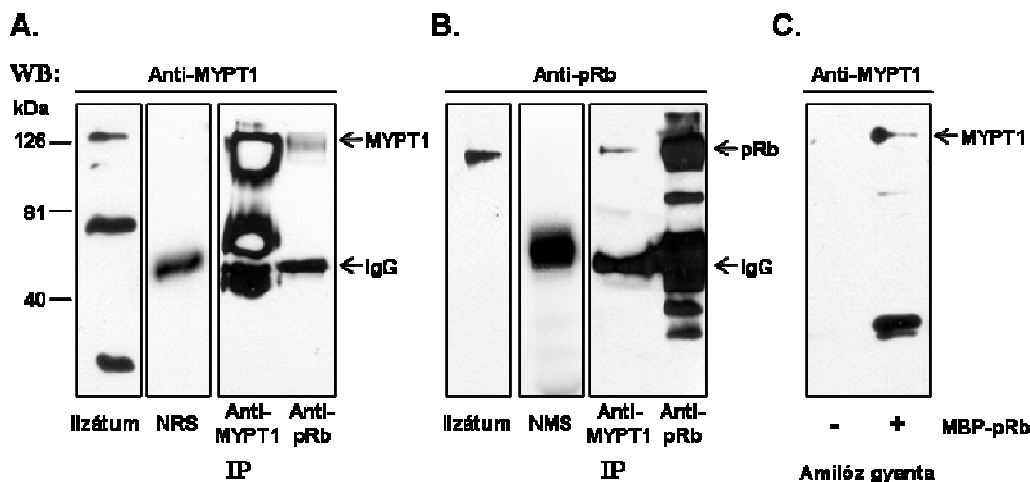
A MYPT1 foszforilációját a Thr695 és Thr850 oldalláncokon CL-A és DNR kezelések hatására anti-MYPT1^{pT695} és anti-MYPT1^{pT850} antitestekkel mutattuk ki. Az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel történő Western blotot a géltre felvitt hasonló fehérjemennyiségek kimutatására végeztük.

Az *in vitro* foszfatáz aktivitás mérések alapján tehát feltehető, hogy a MP jelentős szerepet játszik a pRb defoszforilációjában. Ezért tanulmányoztuk, hogy hogyan változik a MYPT1 foszforilációs szintje a THP-1 sejtek CL-A kezelését követően. A CL-A-nak a pRb

foszforilációt fokozó hatása ugyanis feltételezhető úgy is, hogy az a pRb-foszfataz aktivitást nem közvetlenül, hanem közvetett módon, a PP1c-hez kapcsolódó regulátor fehérjék gátló foszforilációs helyeinek foszforilációs szintjét növelve idézi elő. Ezért a továbbiakban a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációját vizsgáltuk THP-1 sejtek különböző kezelését követően. A sejteket SDS-lízispufferben tártuk fel, majd Western blot analízisnek vetettük alá foszforilált Thr695-re és Thr850-re specifikus antitestekkel. A géltre föl vitt MYPT1 fehérje mennyiségek hasonlóságát anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel előhívott blottal igazoltuk (16. D. ábra, felső sáv). Kezeletlen és DNR-rel kezelt sejtekben a Thr695 oldallánc viszonylag kismértékben foszforilált, míg a Thr850 oldallánc foszforilációja nem mutatható ki. CL-A kezelés hatására azonban mindkét oldallánc foszforilációja jelentősen emelkedik, és a magas foszforilációs szint a DNR-rel való együttes kezelés esetén is fennmarad (16. D. ábra, középső és alsó sáv). A MYPT1 foszforiláció következményeként a MP gátlódik. A MP aktivitásának és a pRb fehérje foszforilációs szintjének párhuzamos változása a MP lehetséges szerepére utal a pRb fehérje defoszforilációjában.

A MYPT1 és a pRb fehérje kölcsönhatásának kimutatása immunprecipitációval és pull-down vizsgálattal

A MP részvétele a pRb defoszforilációjában, valamint ebben a MYPT1 feltételezett célra irányító szerepe a MYPT1 és a pRb fehérjék kölcsönhatására utal, amit először immunprecipitációs és pull-down vizsgálatokkal kívántunk igazolni THP-1 sejtek lizátumában. A MYPT1-pRb komplex kialakulását anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-pRb antitesteket alkalmazva ellenőriztük immunprecipitációs kísérletekben. A THP-1 sejtek lizátumának Western blot analízisével a MYPT1 130-133 kDa méretű fehérjeként detektálható az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel (17. A. ábra, lizátum). Az antitest több, kisebb molekulatömegű - feltételezhetően a teljes hosszúságú MYPT1 proteolitikus degradációjából származó - sávot is felismer. A pRb 110 kDa méretű fehérjeként mutatható ki Western blot módszerrel (17. B. ábra, lizátum). Az anti-pRb antitesttel kapott immunprecipitátumban anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel kimutatható a MYPT1 fehérje (17. A. ábra), míg fordított immunprecipitációs kísérletben, az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest immunkomplexében detektálható a pRb fehérje jelenléte (17. B. ábra). Sem a MYPT1, sem a pRb nem volt detektálható Western blottal azokban a mintákban, amelyekben a specifikus antitestek helyett a megfelelő nem-immun nyúl (NRS) vagy nem-immun egér (NMS) szérumot kapcsolunk a gyantához. Mindezek az eredmények a natív MYPT1 és pRb fehérjék kölcsönhatását igazolják THP-1 sejtek lizátumában.



17. ábra MYPT1 és pRb fehérjék kölcsönhatásának kimutatása immunprecipitációval és pull-down módszerrel

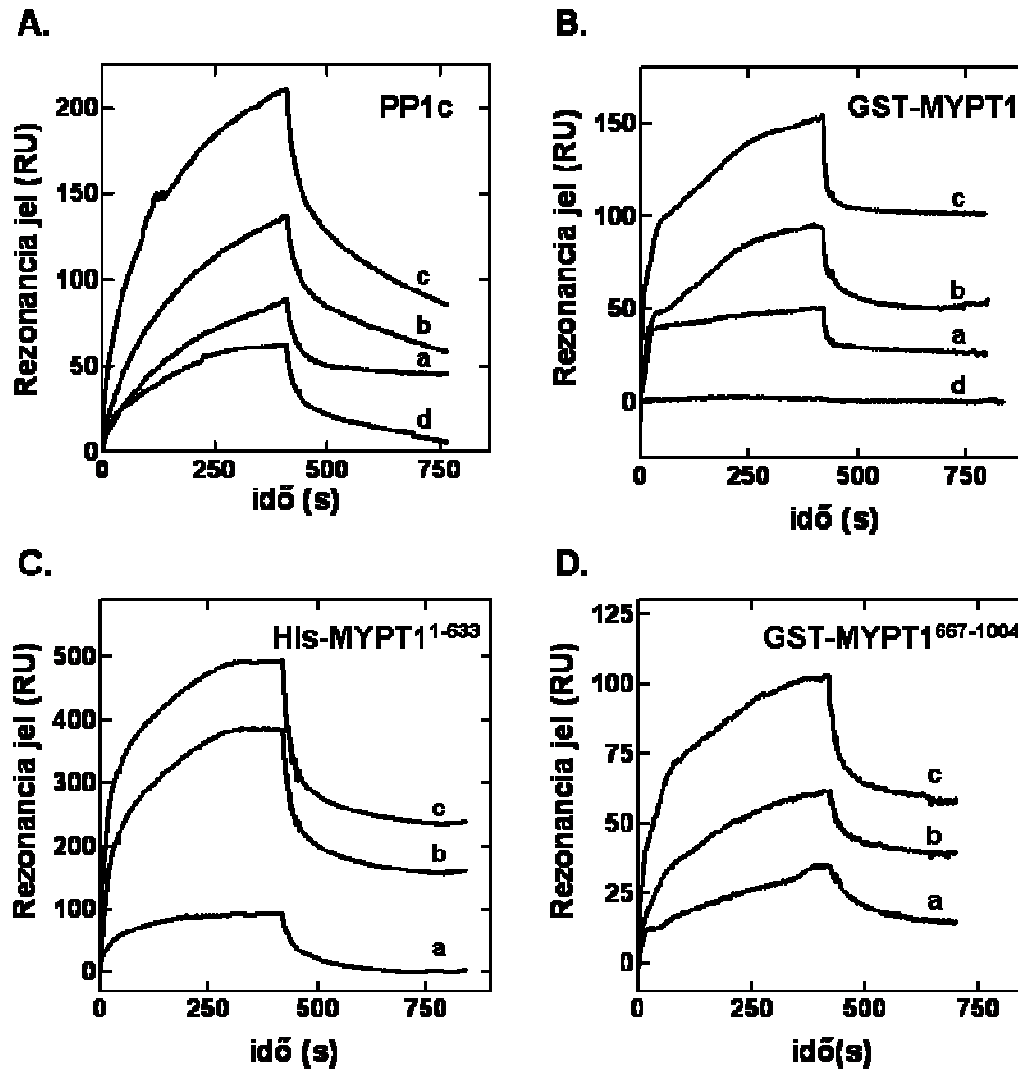
A: MYPT1 és pRb együttes kicsapása THP-1 lizátumból anti-pRb antitest alkalmazásával. B: pRb fehérje precipitációja MYPT1-vel THP-1 sejtlizátumból anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel. Az immunprecipitációs kísérleteket Protein-A Sepharose-hoz kapcsolt anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-pRb antitestekkel végeztük. Kontrollként nem-immun nyúl (NRS) illetve egér szérummal (NMS) kapcsolt Protein-A Sepharose-t alkalmaztunk. A gyantákat a sejtlizátummal történő inkubálás után mostuk, majd SDS-mintapufferben szolubilizáltuk és Western blotot analizáltuk anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-pRb antitestekkel. C: MYPT1 és C-terminális pRb fragmentum (MBP-pRb-C) kölcsönhatásának kimutatása pull-down módszerrel THP-1 sejtek lizátumából. Kapcsolatlan és MBP-pRb-C fúziós fehérjével kapcsolt amilóz gyantát inkubáltunk THP-1 sejtek lizátumával. A kötődő fehérjéket anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel detektáltuk.

A pRb fehérje C-terminális szakasza (pRb-C) számos CDK 2/CDK 4 foszforilációs helyet tartalmaz, és fontos szerepet tölt be a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában. Wu és munkatársai a pRb-C és a MYPT1 N-terminális régiójának kötődését mutatták ki felülrétegzési kísérletben (Wu és mtsai., 2005). A pRb-C és a natív MYPT1 fehérje kölcsönhatásának vizsgálatára pull-down kísérletet végeztünk THP-1 lizátummal. Maltózkötő fehérjével konjugált pRb-C (MBP-pRb-C) fragmentumot kapcsoltunk amilóz gyantához, majd előtisztított THP-1 lizátummal kevertettük 4 órán keresztül. A gyantát az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt összetételű pufferrel mostuk, majd a kapcsolt és azzal kölcsönható fehérjéket SDS-mintapufferben szolubilizáltuk, és immunobloton anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel vizsgáltuk. Kontrollként kapcsolatlan amilóz gyantával is elvégeztük a kísérletet. A Western blot eredmények a MYPT1 és néhány, feltételezhetően MYPT1 degradációs termék kölcsönhatását mutatják a MBP-pRb-C fragmentummal, míg a kapcsolatlan gyanta esetében aspecifikus kötődés nem tapasztalható (17. C. ábra) Ezek az adatok tehát megerősítik a MYPT1 és a pRb fehérje feltételezett kölcsönhatását THP-1 sejtekben.

MYPT1 és pRb kölcsönhatásának jellemzése felületi plazmon rezonancia-méréssel

A MYPT1, PP1c és pRb fehérjék kölcsönhatásának részletes tanulmányozása céljából felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérleteket terveztünk. Irodalmi adatokból ismert (Tamrakar és mtsai., 2000a), hogy a pRb-PP1c kölcsönhatás kialakításában a pRb C-terminális szakasza vesz részt, ezen belül is egy PP1c-kötőmotívumhoz hasonló szekvenciárészlet (874-877 aminosavak, KLRF) játszhat esszenciális szerepet a kölcsönhatásban. A kölcsönhatás SPR módszerrel történő igazolásához MBP-pRb-C-t immobilizáltunk CM5 chip felszínére, majd mértük 0,1 μ M, 0,2 μ M és 0,5 μ M koncentrációban a felületre injektált PP1c kötődését (18. A. ábra). A kapott szenzogramok a PP1c és MBP-pRb-C koncentrációfüggő kölcsönhatását mutatják. A pRb fehérje PP1c-kötőmotívumának szerepét is bizonyítottuk a kölcsönhatásban: a PP1c-vel egyidőben, ekvimoláris mennyiségben injektált PP1c-kötő MYPT1 peptid (MYPT1¹⁻³⁸) nagymértékben gátolta a PP1c kötődését a felszínhez. A pRb-hez való kötődésben szerepet játszó MYPT1 szakaszok feltérképezése céljából rekombináns GST-MYPT1-gyet immobilizáltunk anti-GST antitesttel kapcsolt szenzor chip felszínére, majd különböző koncentrációban (0,5-2 μ M, a-c) MBP-pRb-C-t injektáltunk a felületre. A két fehérje kölcsönhatására jellemző szenzogramot a 18. B. ábra mutatja. A görbe asszociációs szakasza egy gyorsabb és egy lassabb fázisra tagolódik, ami alapján feltételezhető, hogy a MYPT1 és MBP-pRb-C közötti kölcsönhatás több lépésben és/vagy több kötőhelyen keresztül alakul ki. Számottevő kölcsönhatás nem volt mérhető a GST-MYPT1 és a MBP között (18. B. ábra, d), ami alátámasztja, hogy a fenti kötődési mintázat a MYPT1 és a pRb-C specifikus kölcsönhatásának tulajdonítható. A MYPT1 kölcsönható régióinak azonosítása céljából N-terminális (His-MYPT1¹⁻⁶³³) és C-terminális (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) MYPT1 fragmentumokkal is elvégeztük az SPR-méréseket. A His-MYPT1¹⁻⁶³³ fragmentumot szabad amino-csoportokon keresztül kovalens kapcsolással immobilizáltuk, majd mértük az MBP-pRb-C fragmentum kötődésének erősségét. A kapott szenzogram alapján megállapítható, hogy a MBP-pRb-C fragmentum kötődik a MYPT1 N-terminális régiójához (18. C. ábra). A C-terminális MYPT1-gyel végzett vizsgálat azt mutatja, hogy a MBP-pRb-C fragmentum az anti-GST antitestten keresztül immobilizált GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴-hez is kötődik 0,5-2 μ M koncentrációtartományban (18. C. ábra, a-c). A szenzogramok alapján a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével határoztuk meg a pRb-C és PP1c, valamint a teljes MYPT1, és az N- és C-terminális fragmentumának kölcsönhatására jellemző asszociációs állandókat (K_a). Az illesztések eredményeként PP1c-re $K_a = 1,42 \pm 0,12$

$\times 10^6$, a GST-MYPT1-re $K_a = 1,34 \pm 0,42 \times 10^7$, a His-MYPT1¹⁻⁶³³ fragmentumra $K_a = 4,46 \pm 3,1 \times 10^6$, míg a GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ $K_a = 3,28 \pm 1,11 \times 10^6$ értékek adódtak.



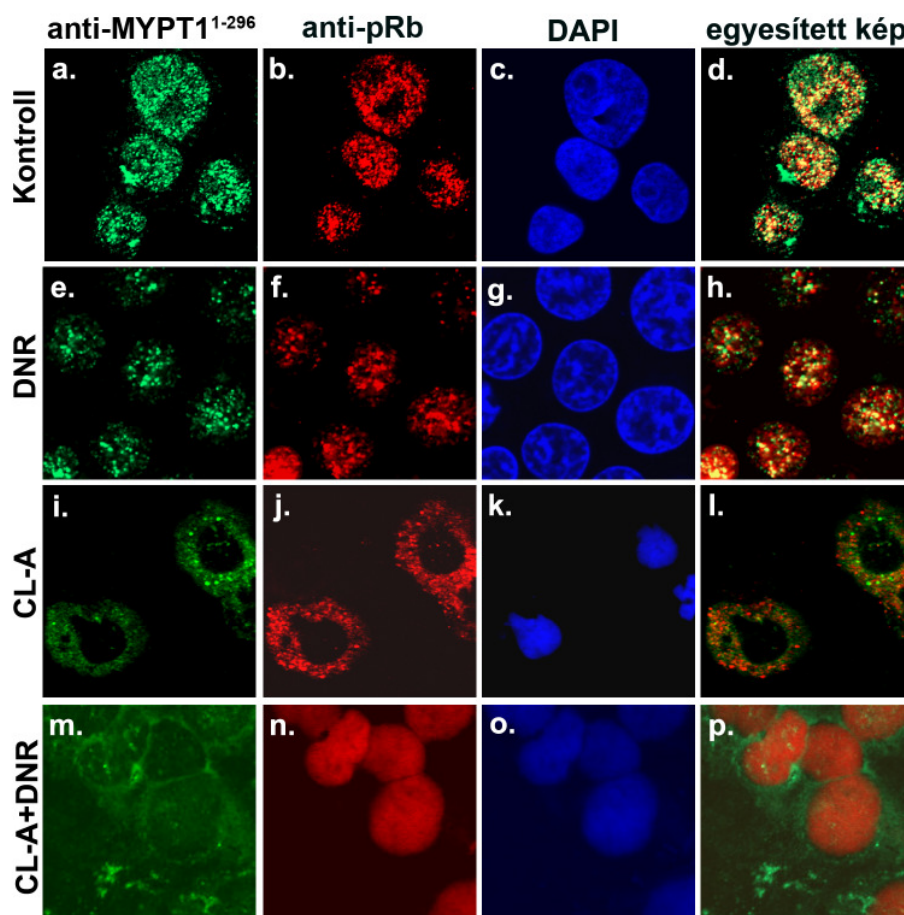
18. ábra MBP-pRb-C kölcsönhatásának jellemzése PP1c és MYPT1 fehérjékkel felületi plazmon rezonancia módszerrel

A: Amino-csoporton keresztül történő kapcsolási reakció segítségével MBP-pRb-C fragmentumot immobilizáltunk CM5 szenzor chip felületére, majd PP1c-t injektáltunk a felszínre 0,1 μM (a), 0,2 μM (b) és 0,5 μM (c) koncentrációban, illetve 0,2 μM PP1c esetén 0,2 μM MYPT1¹⁻³⁸ peptid jelenlétében is elvégeztük a mérést (d). CM5 szenzor chip felszínére GST-MYPT1 (B), His-MYPT1¹⁻⁶³³ (C) és GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (D) fehérjéket immobilizáltunk anti-GST antitesttel (A és C), illetve amino-csoporton keresztül közvetlen kapcsolással (B). Az immobilizált felületre 0,5 μM (a), 1 μM (b) és 2 μM (c) koncentrációban MBP-pRb-C fragmentumot injektáltunk. A szenzogramok a kölcsönhatás következtében fellépő rezonancia jel-változást mutatják az idő függvényében. Kontroll kísérletben 2 μM MBP-t injektáltunk a GST-MYPT1-felületre. A méréseket Biacore 3000 készüléken végeztük az „Anyag és módszerek” fejezetben leírtak szerint.

Megjegyzendő, hogy a K_a értékek hibája viszonylag nagy, ennél fogva csak közelítő értékeknek tekinthetjük őket. A pontos mechanizmus és a jellemző kinetikai paraméterek meghatározása további részletes vizsgálatokat igényel.

pRb és MYPT1 kolokalizációja és foszforilációja THP-1 sejtekben

Az immunprecipitációs kísérletek a MYPT1 és pRb sejten belüli kölcsönhatását feltételezik, ezért a továbbiakban a fehérjék lokalizációját vizsgáltuk intakt THP-1 sejtekben konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal. A sejteket fixálás után a MYPT1-re és a pRb-re specifikus poliklonális és monoklonális antitestekkel jelöltük, majd az immunreakció detektálására fluoreszcens festékekkel konjugált második antitesteket alkalmaztunk.

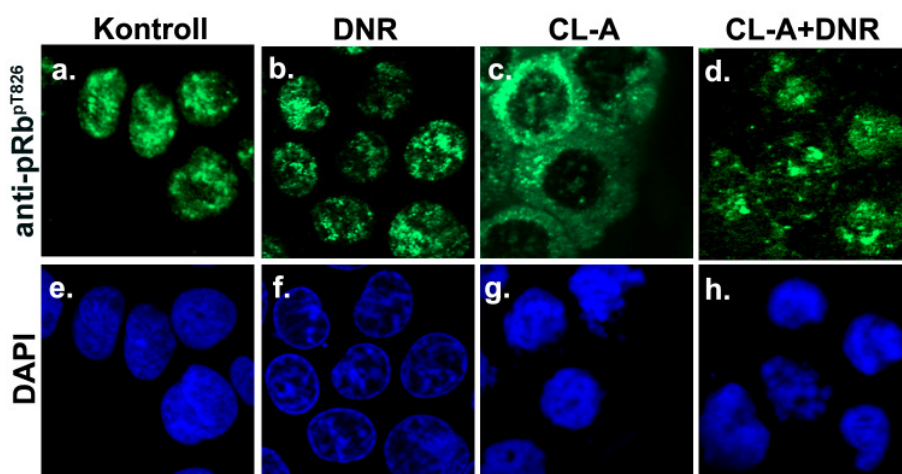


19. ábra **CL-A és DNR hatása a MYPT1 és a pRb eloszlására THP-1 sejtekben**

Széruméheztetett THP-1 sejteket inkubáltunk effektorok nélkül (a-d), 2 $\mu\text{g/ml}$ DNR (e-h), 50 nM CL-A (i-l) vagy CL-A és DNR együttes jelenlétében (m-p). Kezelés után a fixált sejteket anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (a, e, i, m, zöld) és anti-pRb (b, f, j, n, piros) antitestekkel jelöltük. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). Az egyesített képek az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ és anti-pRb festések egymáshoz viszonyított eloszlását mutatják (d, h, l, p).

A fehérjék sejten belüli eloszlását és kolokalizációját a 19. ábra mutatja. Kontroll (a, b) és DNR-kezelt (e, f) sejtekben a MYPT1 és a pRb is főképp a sejtmagban lokalizálódik. Az egyesített kép a két fehérje részleges kolokalizációját mutatja (d, h). CL-A kezelés hatására mind a MYPT1 (i), mind a pRb (j) a citoplazmába transzlokálódik. Ezzel szemben CL-A és DNR együttes kezeléseket követően a MYPT1 és pRb eltérő eloszlása figyelhető meg, mivel a MYPT1 a citoplazmában lokalizálódik (m), míg a pRb sejtmagi festődést mutat (n).

A Thr826 oldalláncon foszforilált pRb lokalizációjának változását is vizsgáltuk konfokális mikroszkópiával anti-pRb^{pT826} antitesttel (20. ábra). Kontroll (a) és DNR-kezelt (b) sejtekben a pRb foszforilációs szintje eltérő, de mindkét esetben sejtmagi lokalizációt mutat. CL-A kezelés (c) hatására a pRb Thr826 oldalláncon foszforilált formája a citoplazmába transzlokálódott, ellenben ha a CL-A kezelést DNR hozzáadása követte (d) a pRb^{pT826} a sejtmagban maradt. A pRb^{pT826} lokalizációja tehát hasonló a nem-foszfospecifikus, foszforilált és defoszforilált pRb-t egyaránt felismerő antitesttel kapott mintázathoz. Ezen megfigyelés alapján feltételezhető, hogy a CL-A által indukált pRb-transzlokációért nem a Thr826, hanem valamely más pRb oldallánc vagy egy eddig még nem azonosított, a pRb sejtmagi exportjában szerepet játszó fehérje foszforilációja felelős.

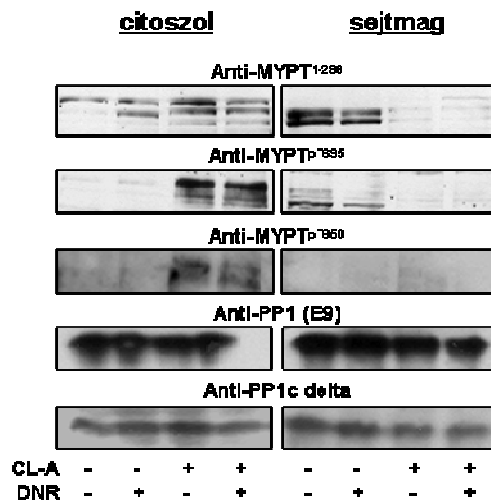


20. ábra pRb^{pT826} lokalizációja THP-1 sejtekben CL-A és DNR kezelést követően

THP-1 sejteket inkubáltunk effektorok nélkül (a, e), 2 µg/ml DNR (b, f), 50 nM CL-A (c, g) vagy CL-A és DNR jelenlétében (d, h). A fixált sejteket anti-pRb^{pT826} (a-d, zöld) ellenanyaggal és DAPI-val (e-f, kék) festettük, és konfokális mikroszkóppal detektáltuk.

A különböző kezelések hatását a fehérjék sejten belüli lokalizációjára THP-1 sejtek szubcelluláris frakcióinak vizsgálatával is megerősítettük. MYPT1 és PP1c megoszlását tanulmányoztuk THP-1 sejtek citoszol és sejtmag frakcióinak Western blot analízisével. Az immunoblottokat a 21. ábra szemlélteti. Kontroll és DNR-rel kezelt sejtekben a MYPT1

elsősorban a sejtmagban található meg. A MYPT1 foszforilációs szintje nagyon alacsony, csak a Thr695 oldalláncon detektálható, a Thr850 foszforilációja nem mutatható ki, ami összhangban van a teljes lizátummal kapott blotok eredményével (16. ábra.). CL-A kezelés hatására a MYPT1 és a pRb is a citoszolba transzlokálódik. A foszforilációval és transzlokációval párhuzamosan a MYPT1 fehérjesávok magasabb molekulatömeg felé történő eltolódása is megfigyelhető. A fehérje csökkent mobilitása feltehetőleg foszforilációs szintjének növekedésével indokolható. A Thr695 és Thr850 oldalláncon okadánsav kezelés után megnövekedett foszforilációja HepG2 sejtekben ugyanakkor nem befolyásolja a MYPT1 fehérjesávok vándorlását SDS-poliakrilamid gélben (Lontay és mtsai., 2005). Ezért valószínűsíthető, hogy a MYPT1 eltolódása a Thr695 és Thr850 oldallánconoktól eltérő foszforilációs hely(ek) foszforilációjának eredménye. Feltételezhető tehát, hogy ezen ismeretlen foszforilációs hely(ek) foszforilációja szabályozza a MYPT1 CL-A által indukált nukleáris exportját. A PP1c izoformák lokalizációját is feltérképeztük a különböző módon kezelt THP-1 sejtek szubcelluláris frakcióiban. A vizsgálatokhoz a PP1c δ izoformára specifikus anti-PP1c δ antitestet és a PP1 α -t és PP1 γ -t felismerő anti-PP1 (E9) ellenanyagot használtuk. A különböző PP1c izoformák citoszolikus és sejtmagi eloszlást mutatnak, az alkalmazott kezelések lokalizációjukat nem befolyásolják. Az eredmények arra utalnak, hogy a MYPT1 transzlokációja a sejtmagból a citoszolba önmagában, a PP1c részvétele nélkül valósul meg.



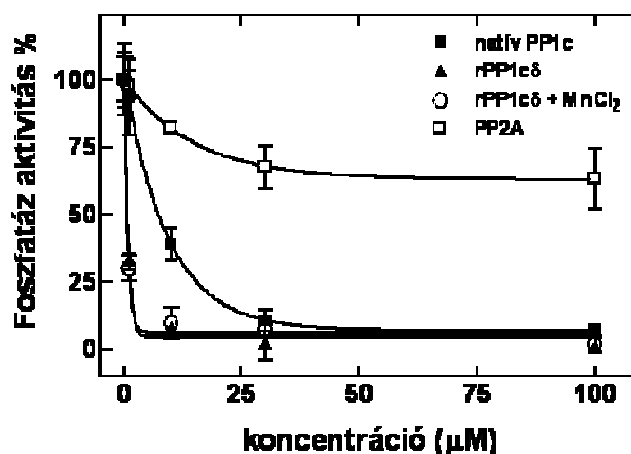
21. ábra MYPT1 és PP1c lokalizációja THP-1 sejtek szubcelluláris frakcióiban CL-A és DNR kezelést követően

CL-A-, DNR-, valamint CL-A plusz DNR-kezelt THP-1 sejtek lizátumából citoszolikus és sejtmag frakciókat izoláltunk, majd immunobloton anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, anti-MYPT1^{pT695}, anti-MYPT1^{pT850}, anti-PP1c δ és anti-PP1 (E9) antitestekkel vizsgáltuk.

Tanninok foszfatázgátló hatásának vizsgálata

Tanninok hatása PP1 és PP2A enzimek aktivitására

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a tanninok illetve azok komponenseinek biológiai hatásában szerepe lehet a protein foszfatázok gátlásának (Erdélyi és mtsai., 2005; Qin és mtsai., 2008). Ezen felvetés vizsgálata céljából *in vitro* tanulmányoztuk a tanninok foszfatázgátló hatását. Először a penta-O-galloil-D-glükóz (PGG), a tanninok egyik fő alkotórészének hatását vizsgáltuk natív és rekombináns PP1c, valamint PP2A enzimek aktivitására.

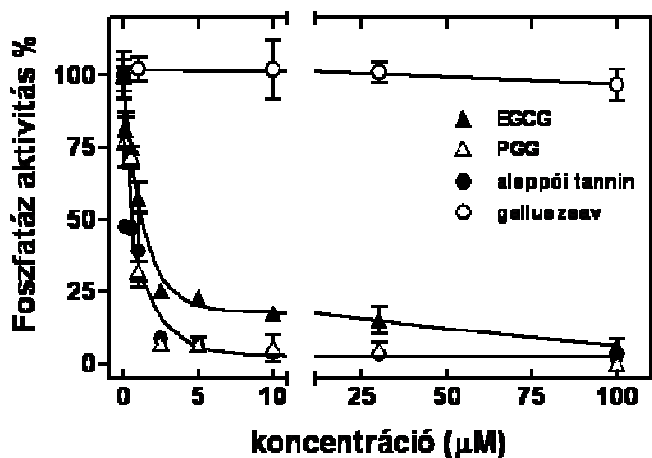


22. ábra PGG hatása natív és rekombináns PP1c, valamint PP2Ac aktivitására

PP1c-t (1,25 μg/ml), rPP1c-t (5 μg/ml), rPP1c-t 1 mM MnCl₂ jelenlétében, valamint PP2Ac-t (3 μg/ml) inkubáltunk 10 percig 30°C-on 0, 1, 10, 30 és 100 μM PGG jelenlétében, majd mértük az enzimek foszfatázaktivitását 1 μM ³²P-MLC20 szubsztráttal. Az eredményeket a PGG távollétében kapott foszfatáz aktivitás %-ában adtuk meg.

A 22. ábrán bemutatott eredmények szerint a PGG igen hatékonyan gátolja a PP1 enzimeket (natív PP1c: IC₅₀ = 6,5 μM, rPP1cδ: IC₅₀ = 0,7 μM), ugyanakkor a PP2Ac aktivitására kifejtett gátló hatása sokkal kisebb (IC₅₀ > 100 μM). Felmerülhet a kérdés, hogy a PGG gátló hatását nem azáltal fejtje-e ki, hogy komplexet alkot a PP1c aktív centrumában található kétértékű fémionokkal. Ennek ellenőrzésére rPP1cδ esetén 1 mM MnCl₂ jelenlétében is elvégeztük a gátló hatás vizsgálatát. Látható, hogy a gátlás Mn²⁺-ion hozzáadása mellett is változatlanul fennmarad (IC₅₀ = 0,8 μM), a PGG gátló hatása tehát nem a fémionok elvonása révén valósul meg. Mivel a PGG a rekombináns enzimet is hatékonyan gátolta, valamint megfelelő mennyiségben is ez az enzim nyerhető ki, a további méréseinkhez rPP1cδ-t használtuk. A PGG mellett az epigallokatekin-3-gallát (EGCG), valamint az aleppói tannin (egy természetes keverék), és az egyik építőelem, a galluszsav hatását is megvizsgáltuk a rPP1cδ

aktivitására. Mind az aleppói tannin, mind a tisztított vegyületek (PGG és EGCG) csökkentették a rPP1c δ aktivitását, ugyanakkor a galluszsav nem volt gátló hatású (23. ábra). Az IC₅₀ érték aleppói tanninra 0,52 μ M-nak, EGCG-re 0,93 μ M-nak adódott.

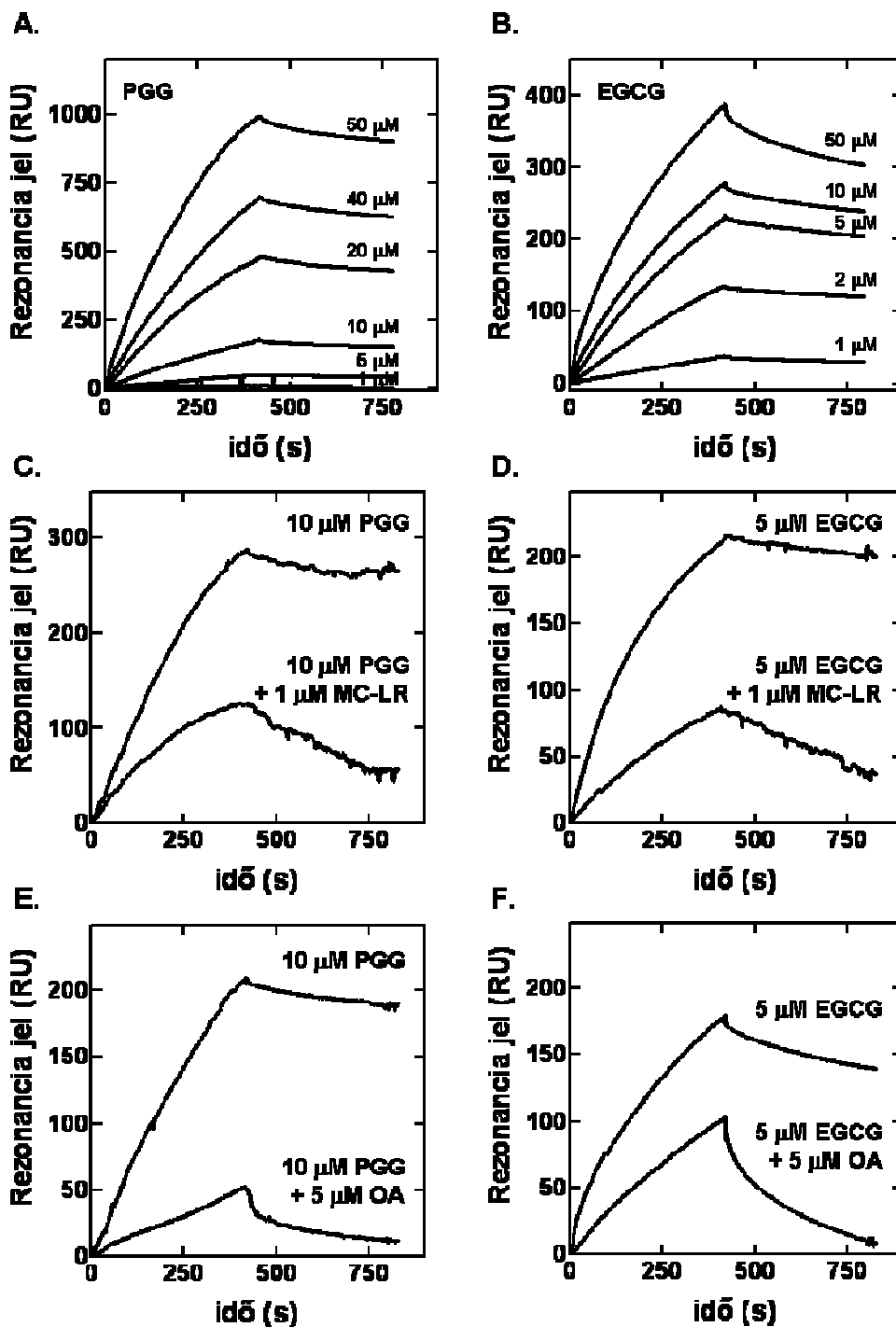


23. ábra EGCG, PGG, aleppói tannin és galluszsav hatása a rPP1c δ aktivitására
5 μ g/ml rPP1c δ -t inkubáltunk 30°C-on 10 percig a különböző tanninszármazékokkal 0-100 μ M koncentrációban, majd mértük a foszfátáz aktivitást ³²P-MLC20 szubsztráttal.

PGG és EGCG rPP1c δ -hoz való kötődésének vizsgálata felületi plazmon rezonancián alapuló módszerrel

A tanninszármazékokkal való kölcsönhatás SPR módszerrel történő igazolásához amino-csoportokon keresztül rPP1c δ -t immobilizáltunk CM5 chip felszínére, majd különböző koncentrációban (1-50 μ M) PGG-t vagy EGCG-t injektáltunk, és mértük a kötődés következtében fellépő rezonancia jel-változást (24. A. és B. ábra). Mindkét molekula kölcsönhatást alakított ki a rPP1c δ -val, egy lassú asszociációs és szintén lassú disszociációs kinetikával. Az asszociációs állandó értéke PGG-re $K_a = 2,52 \pm 1,06 \times 10^5$ -nek, EGCG-re $K_a = 1,48 \pm 0,67 \times 10^6$ -nak adódott.

A tannin származékok aromás (hidrofób) gyűrűinek lehetséges részvétele a PP1c-vel való kötődésben felveti ezen molekuláknak a PP1c hidrofób árkával való kölcsönhatásának valószínűségét. Mivel a PP1c-t gátló toxinok is részben a hidrofób árokban kötődnek, ezért lehetséges kompetíciót feltételezve megvizsgáltuk a tanninok kötődését foszfátázgátló toxinok, MC-LR és OA jelenlétében is. Rekombináns PP1c δ -val borított felületet 1 μ M MC-LR-el telítettünk, majd mértük 10 μ M PGG vagy 5 μ M EGCG kötődését, és az adatokat összehasonlítottuk a kezeletlen rPP1c δ -felületen kapott kötődési értékekkel. OA esetén a felület telítése után a PGG-t illetve az EGCG-t 5 μ M OA-val együtt injektáltuk a felületre.

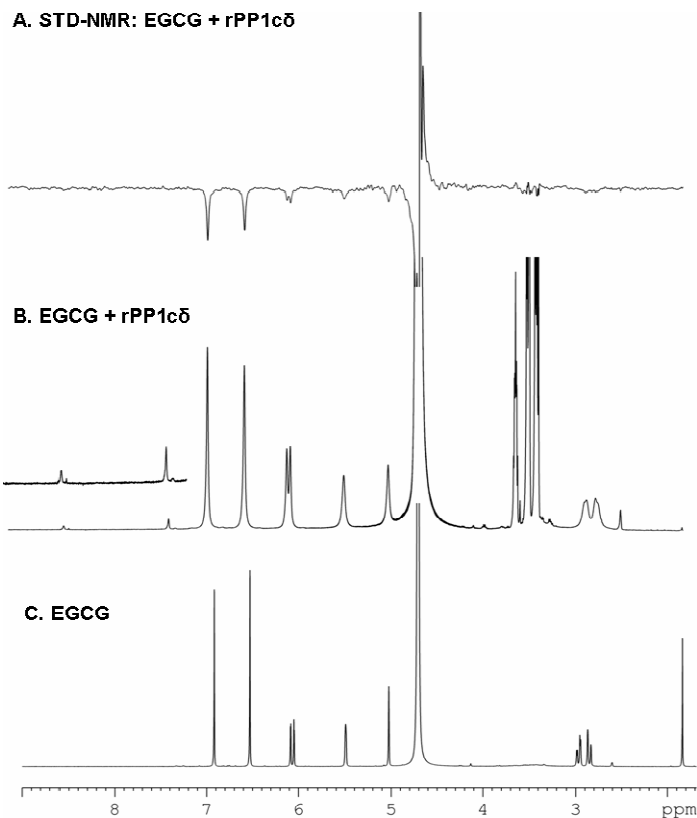


24. ábra rPPIc δ kölcsönhatásának vizsgálata PGG-vel és EGCG-vel SPR módszer segítségével CM5 chip felületére rPPIc δ -t immobilizáltunk, majd 1-50 μ M koncentrációban PGG-t (A) vagy EGCG-t (B) injektáltunk, és rögzítettük a kölcsönhatás következtében fellépő rezonancia jel-változás asszociációs és disszociációs szakaszát. C-F: MC-LR és OA hatása a rPPIc δ és tannin alkotórészek kölcsönhatására. rPPIc δ -vel borított felületre MC-LR-t injektáltunk, majd mértük 10 μ M PGG (C) vagy 5 μ M EGCG (D) kötődését. OA-val telített rPPIc δ -felületre 5 μ M OA-val együttesen PGG-t (E) vagy EGCG-t (F) injektáltunk.

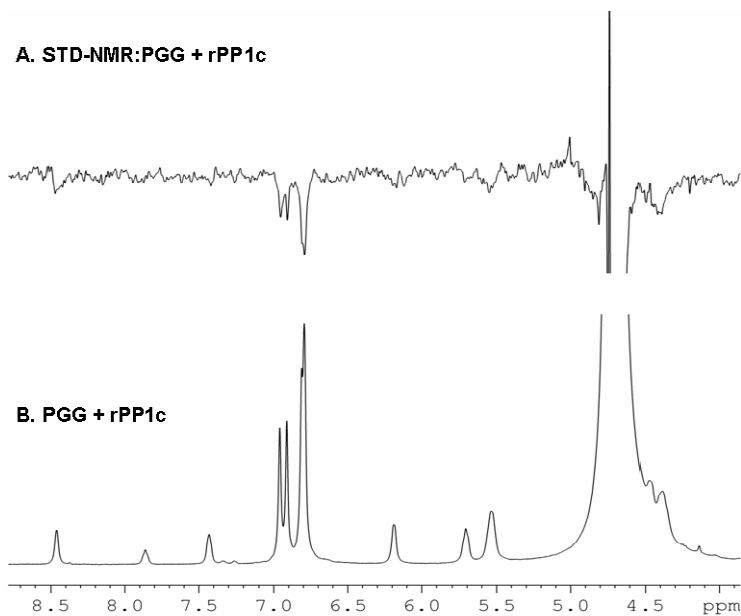
A MC-LR-el illetve OA-val telített rPP1c δ -felületen a PGG és az EGCG sokkal kisebb mértékben kötődött, mint a rPP1c δ -hoz önmagában. Megfigyelhető az is, hogy a rPP1c δ -PGG és rPP1c δ -EGCG komplexek disszociációja sokkal gyorsabb volt, mint a toxinokkal nem kezelt felületeken. (24. C-F. ábra). A MC-LR és OA a PP1c Y-alakú katalitikus centrumának hidrofób árkához kötődnek és részben lefedik az aktív centrumot, ezáltal fejtik ki gátló hatásukat. A PGG és EGCG kötődésének csökkenése az inhibitorok jelenlétében azt mutatja, hogy feltehetőleg a tanninszármazékokkal való kölcsönhatásban is a PP1c aktív centrumának hidrofób árka játszik szerepet.

A PP1c és a tannin származékok kölcsönhatásának NMR-spektroszkópiás vizsgálata és molekuláris modellezése

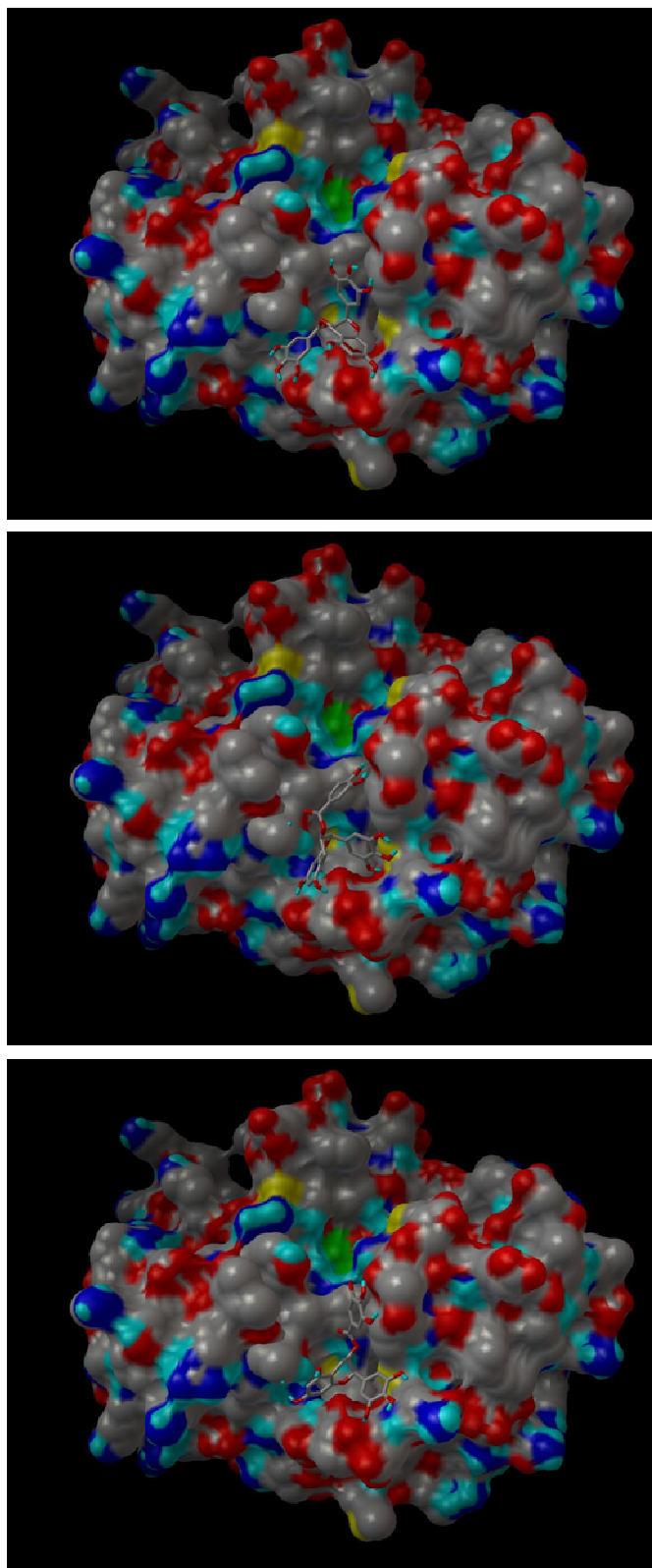
A PP1c kölcsönhatását az EGCG-vel és a PGG-vel NMR-spektroszkópiás módszerekkel is vizsgáltuk, az ún. telítés átviteli differencia (Saturation Transfer Difference, STD) módszer alkalmazásával (Mayer és Meyer, 1999; Tóth és mtsai., 2000b; Mayer és Meyer, 2001; Meyer és Peters, 2003). Ezzel a módszerrel a kismolekulájú kölcsönható partner azon szerkezeti részéről kaphatunk információt, amelyek kölcsönhatásba lépnek a fehérjékkel. Először az EGCG molekula PP1c-vel való kölcsönhatását tanulmányoztuk. A méréseket Dr. E. Kövér Katalin (DE TEK Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) végezte. A 25. C. ábrán az EGCG ^1H -NMR-spektruma látható, amelyen a D_2O jelenléte miatt a cserélhető hidroxil protonok nem adnak jelet, csak az aromás és az oxigént tartalmazó gyűrűk rezonancia jelei azonosíthatók. A 25. B. ábra az EGCG spektrumát mutatja, nátrium-acetát/ D_2O pufferben (pH = 7,0) dializált PP1c jelenlétében. A jelek kiszélesedése a spektrumban a fehérjével való kölcsönhatásra utal, valamint igen kis intenzitással megjelennek a hidroxil protonok jelei is. Ez utóbbi annak tulajdonítható, hogy a hidroxil protonok részlegesen cserélődnek deutériumra, ami a fehérjével való kölcsönhatásuknak a következménye. A 25. A. ábrán az STD-NMR-spektrum látható, amikor a fehérje protonátmeneteit szelektív besugárással telítjük, és a kapott differencia spektrum a ligand azon H-atomjainak jeleit mutatja, amelyek a fehérjével kölcsönhatásba kerültek. Az STD-spektrumban megjelenő aromás protonjelek arra utalnak, hogy az EGCG aromás gyűrűi részt vesznek a fehérjével való hidrofób kölcsönhatásban. A 26. B. ábrán a PGG ^1H -NMR spektruma a fehérje jelenlétében, valamint az előzőekben leírt módon felvett STD-NMR-spektrum (26. A. ábra) látható. Ezek az adatok szintén arra utalnak, hogy mind az aromás gyűrűknek, mind pedig a fenolos hidroxil-csoportoknak szerepe van a PP1c-vel való kölcsönhatásban.



25. ábra EGCG és rPP1c δ kölcsönhatásának vizsgálata ^1H -NMR spektroszkópiával
 A: Az EGCG telítés átviteli differencia (STD) ^1H -NMR-spektruma rPP1c δ jelenlétében. B: Az EGCG ^1H -NMR-spektruma rPP1c δ jelenlétében. C: Az EGCG ^1H -NMR-spektruma. A mérések során Na-acetát/D₂O pufferben dializált rPP1c δ -t alkalmaztunk.



26. ábra PGG és rPP1c δ kölcsönhatásának vizsgálata ^1H -NMR spektroszkópiával
 A: A PGG telítés átviteli differencia (STD) ^1H -NMR-spektruma rPP1c δ jelenlétében. B: A PGG ^1H -NMR-spektruma rPP1c δ jelenlétében. A mérésekhez Na-acetát/D₂O pufferben dializált rPP1c δ -t alkalmaztunk.

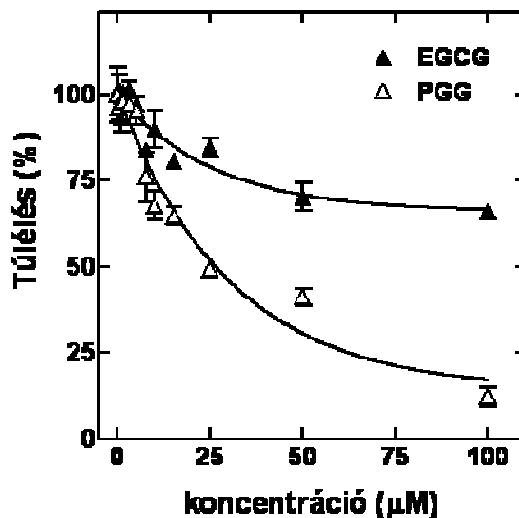


27. ábra A PP1c-EGCG kölcsönhatás számítógépes modellezéssel kapott legkisebb energiájú konformációs formái

A kötődési és szerkezeti vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy a tanninszármazékok PP1c gátló hatása az enzim aktív centrumának hidrofób árkához való kötődésnek tulajdonítható. Mivel a PP1c kristályszerkezetét már számos inhibitorral (Goldberg és mtsai., 1995; Tóth és mtsai., 2000b; Maynes és mtsai., 2001; Kita és mtsai., 2002) meghatározták, az adatbázisokban rendelkezésre állnak a fehérje atomi koordinátái, amelyek lehetővé teszik új kölcsönható ligandok dokkolását megfelelő számítógépes modellezési módszerekkel. Dr. Komáromi István (DE OEC Klinikai Kutatóközpont) által végzett előzetes EGCG dokkolási kísérletek eredményeit a 27. ábra mutatja, amelyen a három legkisebb energiájú konformációs család egy-egy képviselőjét látjuk. Ezek mindegyike azt igazolja, hogy az EGCG molekula az enzim hidrofób árkához kötődik, valamint azonosíthatók azok a fenolos hidroxilok is, amelyek intermolekuláris H-kötések által stabilizálják a kölcsönhatást. A kötött állapotú EGCG konformáció változását és az aromás gyűrűk térbeli közelségét az NMR-mérések is alátámasztották.

PGG és EGCG hatásának vizsgálata THP-1 sejtek életképességére Alamar Blue proliferációs módszerrel

Irodalmi adatok szerint az EGCG és a PGG gátolják a daganatos sejtek növekedését, és apoptózist indukálva jelentős mértékben befolyásolják azok életképességét (Ahmad és mtsai., 1997; Pan és mtsai., 1999; Yang és mtsai., 2002).



28. ábra PGG és EGCG hatásának vizsgálata THP-1 sejtek életképességére Alamar Blue proliferációs módszerrel

THP-1 sejteket kezeltünk 0-100 µM koncentrációban PGG-vel vagy EGCG-vel 24 órán keresztül, majd Almar Blue proliferációs módszerrel mértük a sejtek életképességét az „Anyag és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A sejtek túlélését a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva %-os értékben adtuk meg.

Az EGCG és a PGG ezen hatását THP-1 sejteken ellenőriztük, és azt találtuk, hogy az EGCG és a PGG eltérő hatással van a sejtek életképességére. Azonos koncentrációban a PGG nagyobb mértékű sejtpusztulást eredményezett, mint az EGCG. Annak tisztázására, hogy ezen molekulák milyen mechanizmus szerint fejtik ki hatásukat, és abban milyen szerepe lehet foszfatázgátló szerepüknek, további kísérleteket tervezünk.

MEGBESZÉLÉS

A miozin foszfatáz szabályozása a MYPT1 alegység foszforilációjával

Irodalmi adatokból ismert, hogy a MP szabályozásának egyik fő mechanizmusa a regulátor alegység foszforilációja által valósul meg. A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncairól kimutatták, hogy ROK által foszforilálhatók (Kawano és mtsai., 1999). Az eddig leírt mechanizmusok szerint a Thr695 oldallánc foszforilációja eredményezi a katalitikus aktivitás gátlását (Ichikawa és mtsai., 1996b; Feng és mtsai., 1999), míg a Thr850 foszforilációja a MYPT1 miozinhoz való kötődését gyengíti (Velasco és mtsai., 2002). Számos közlemény támasztja alá a Thr695 foszforilációjának szerepét a MP szabályozásában simaizom (Shin és mtsai., 2002; Ito és mtsai., 2003; Seko és mtsai., 2003; Wang és mtsai., 2003; Hersch és mtsai., 2004) és nem-izom (Feng és mtsai., 1999; Watanabe és mtsai., 2001; Somlyó és mtsai., 2003b; Lontay és mtsai., 2005) sejtekben egyaránt, ugyanakkor arra vonatkozólag is számos adat van, hogy bizonyos körülmények között a Thr850 oldallánc domináns foszforilációja figyelhető meg (Kitazawa és mtsai., 2003; Niuro és mtsai., 2003; Ren és mtsai., 2004; Wilson és mtsai., 2005). A Thr850 dinamikus szerepét feltételezi a MP szabályozásában az a megfigyelés is, miszerint ez az oldallánc gyorsan és hatékonyan defoszforilálódik *in vitro*, míg a Thr695 gyakorlatilag ellenáll a defoszforilációnak (Takizawa és mtsai., 2002b). A gátlás biokémiai háttérben az állhat, hogy a Thr695 és a Thr850 oldallánccok környezetében lévő N-terminális bázikus és C-terminális hidrofób aminosavakat tartalmazó szekvenciák szubsztrátanalóg módon képesek a PP1c aktivitását gátolni a katalitikus centrumhoz történő kötődésük által. A gátlás pontos mechanizmusa azonban még nem ismert, különösen abban a tekintetben, hogy a MYPT1 C-terminális felében található foszforilált oldallánccok milyen fehérje mozgások következtében kerülnek a katalitikus centrum közelébe.

MLC20^{pT18pS19}: **RAKAKTTKKRPQRApTpSNVFAMF**
MYPT1^{pT695}: **QRKARSRLMRQSRRSpTQGVTLT**
MYPT1^{pT850}: **KSIRFRRRPREKRRSpTGVSFWT**

29. ábra A MP szubsztrát MLC20 és a MYPT1 gátló foszforilációs helyek környezete aminosav szekvenciájának hasonlósága

Kísérleteink során treonin-alanin pontmutációt (MYPT1^{T695A}, MYPT1^{T850A} és MYPT1^{AAA}) tartalmazó MYPT1 mutánsokat alkalmaztunk a Thr695 és Thr850 oldallánccok ROK általi foszforilálhatóságának és a foszforiláció következtében fellépő gátló hatás

vizsgálatára. Eredményeink arra utalnak, hogy nemcsak a Thr695, hanem a Thr850 oldallánc ROK általi foszforilációja is gátolja a natív PP1c aktivitását a fiziológias foszforilált miozin szubsztráttal, és a gátlás hatékonysága mindkét foszforilált oldallánc esetén közel azonos mértékű.

Eredményeink alapján az is valószínűsíthető, hogy a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja a sejtekben eltérő kinázok által valósul meg. A Thr850 a ROK elsődleges foszforilációs helyének tűnik a ROK inhibitor Y27632 alkalmazásával kapott eredményeink alapján. Ezzel összhangban korábban a Thr850 foszforilációját az *in vivo* ROK aktivitás indikátoraként használták (Kawano és mtsai., 1999). A Thr695 oldalláncot foszforiláló kináz(oka)t e vizsgálatok során nem azonosítottuk, de ismert, hogy számos kináz képes a Thr695-t foszforilációjára *in vitro* (Hartshorne és mtsai., 2004). A Rho jelátviteli útvonalat aktiváló LPA kezelés hatására a Thr695 foszforiláció fokozódik. A LPA azonban a RhoA-ROK útvonal mellett több jelátviteli pályát és ezen keresztül számos kinázt aktivál (Moolenaar és mtsai., 2004), így a Thr695 foszforilációért felelős kináz nem azonosítható egyértelműen. Irodalmi adatok szerint a MYPT1 kináz (a ZIP-kináz kisebb molekulatömegű formája), az ILK, a MDPK, a PAK és a Raf-1 is részt vehet a Thr695 foszforilációjában (Somlyó és mtsai., 2003a; Hartshorne és mtsai., 2004). A ROK a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációját azonos mértékben katalizálja *in vitro*, míg *in vivo* megkülönböztetett módon foszforilálódnak. A jelenség hátterében álló mechanizmus nem ismert. Lehetséges, hogy a különböző típusú sejtekben a különböző kinázok hozzáférése az egyes oldalláncokhoz eltérő. Feltételezhető az is, hogy a két oldallánc megkülönböztetett foszforilációja lehetőséget biztosít a MYPT1-re ható eltérő jelátviteli útvonalak egyesítésére. Mindkét oldallánc foszforilációja gátló hatású a PP1c aktivitására, ezáltal egymástól eltérő jelátviteli útvonalaknak is szerepe lehet a MP szabályozásában.

A PP1 és PP2A szerepe a sejtek életképességének szabályozásában

Munkánk során foszfatázgátló toxinok hatását tanulmányoztuk leukémiás sejtek kemoterápiás szerekkel kiváltott sejthalálára, hogy ezáltal betekintést nyerjünk a protein foszfatázoknak a sejtek túlélésében betöltött szerepébe. Eredményeink szerint az *in vitro* PP1 és PP2A enzimeket is gátló membránpermeabilis CL-A koncentráció-függő módon csökkenti a DNR által THP-1 leukémiás sejtekben kiváltott sejthalál mértékét. Magasabb koncentrációk esetén a CL-A önmagában is citotoxikus hatású. A CL-A 50 nM koncentrációban a sejtek életképességét nem csökkenti jelentősen, ugyanakkor hatékonyan gátolja a DNR által kiváltott sejtpusztulást. Citozin-arabinoziddal (egy nukleozid analóg) és etopoziddal (topoizomeráz II

gátló) kezelt leukémiás sejtek esetén a CL-A hasonló mértékű túlélést elősegítő hatását figyelték meg (Dou és mtsai., 1995). Ezen kemoterápiás szerek közvetett módon protein foszfatázokat aktiválnak, ezáltal fokozzák a sejtthál szabályozásában szerepet játszó fehérjék defoszforilációját (Ruvolo, 2001; Chalfant és mtsai., 2002). Az egyik ilyen célfehérje a pRb, amely fehérje foszforilációja a sejtciklus szabályozás fontos eleme. Ismert, hogy a pRb fehérje citozin-arabinozid és etopozid kezelés hatására defoszforilálódik és degradálódik (Dou és mtsai., 1995). Eredményeink azt mutatják, hogy a DNR az előbbi két szerhez hasonló mechanizmussal hat: növeli a protein foszfatázok és a kaszpáz-3 aktivitását, amit a pRb defoszforilációja és degradációja kísér. A CL-A a DNR hatását ellensúlyozza, ugyanis a sejtek előkezelése a toxinnal növeli a pRb foszforilációt, és csökkenti a DNR-rel kiváltott kaszpáz-3 aktiválás mértékét is. A pRb csökkent degradációjának hátterében a DNR által kiváltott kaszpáz-3 aktiváció mérséklése állhat CL-A jelenlétében. Korábban kimutatták, hogy a PP2A gátlása CL-A-val a p38-MAP kináz fokozott foszforilációját és aktivációját eredményezi. A p38-MAP kináz aktív formája foszforilálja a kaszpáz-3-at, amelynek aktivitása a foszforiláció következményeként csökken (Alvarado-Kristensson és Andersson, 2005). Ugyanakkor a CL-A önmagában, más foszfatázgátló toxinokhoz hasonlóan, a kaszpáz-3 aktivitásának növekedését okozza (Boudreau és mtsai., 2007). CL-A jelenlétében azonban a pRb degradációja kisebb mértékű, ugyanis a CL-A egyben fokozza a pRb foszforilációját is, és a foszforilált pRb-t a kaszpáz-3 kevésbé képes hasítani (Wang és mtsai., 2001). Ezzel összhangban 50 nM CL-A kezelés a pRb Thr826 oldallánca foszforilációjának növekedését okozza. Ezen foszforilációs hely ciklin D/CDK4 komplex által foszforilálható, és fontos szabályozó funkciót tölt be a LXCXE-kötőmotívumot tartalmazó fehérjékkel kialakított kölcsönhatásban (Rubin és mtsai., 2001). Foszforilációja (esetlegesen más CDK4 foszforilációs helyekkel együtt) szerepet játszhat a pRb proteolitikus hasítással szembeni ellenállásában. E feltételezett mechanizmust támasztják alá Dou és munkatársai korábbi adatai is, amelyek szerint a pRb fehérje csökkent mértékű degradációja mutatható ki CL-A-val kezelt HL-60 és U-937 leukémiás sejteken (Dou és mtsai., 1995). Megjegyzendő, hogy a fenti saját és irodalmi eredmények némileg ellentmondásban állnak azzal a megfigyeléssel, miszerint Balb/c 3T3 sejtek esetén 50 nM CL-A a PP2A enzim teljes gátlását és a pRb fehérje látszólagos defoszforilációját okozza a sejtciklus G1 fázisában működő ciklin-függő kinázok aktivitásának csökkentése révén (Yan és mtsai., 1999). Ezen eltérő eredmények magyarázata nem ismert, de feltételezhető, hogy a CL-A hatása a pRb foszforilációjára sejt típus-függő, és azt nagymértékben befolyásolhatják a kísérleti körülmények, például a kezelések időtartama is.

A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációs szintjének szabályozásában

A rendelkezésre álló irodalmi adatok azt bizonyítják, a pRb defoszforilációját PP1-típusú enzimek katalizálják a sejtekben (Rubin és mtsai., 2001; Wang és mtsai., 2001). Kimutatták, hogy a PP1c az alulfoszforilált pRb-hez (Durfee és mtsai., 1993) és a defoszforilált pRb C-terminális fragmentumához is kötődik (Tamrakar és mtsai., 2000a). Eredményeink szerint a PP1c csak kismértékben defoszforilálja a pRb-C szubsztrátot. SPR kötődési kísérletet végezve megerősítettük, hogy a PP1c és a defoszforilált pRb fragmentum között létrejövő kölcsönhatás meglehetősen stabil ($K_a \sim 10^6$), és a komplex kialakításában fontos szerepe van a pRb PP1c-kötőmotívumhoz hasonló szekvenciájának (Tamrakar és mtsai., 2000a). Feltételezték, hogy a pRb regulátor alegységszerű funkciót tölt be ebben a komplexben, és módosítja a PP1c aktivitását más szubsztrátmolekulákkal. Erre utalt az is, hogy a pRb-C a PP1 α izoformához kötődve csökkenti annak foszforiláz foszfatáz aktivitását. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a foszforilált pRb-vel komplexet alkotó PP1c feltehetően nem a katalitikus aktivitás szempontjából kedvező pozícióban kötődik. Ennek tulajdonítható a PP1c kismértékű foszfatáz aktivitása a foszforilált pRb-C szubsztráttal. Az is ismert, hogy a PP1c asszociációja a pRb-vel annak foszforilációjától függ: létrejön a kölcsönhatás a Ser608, Ser612, Ser780 és Ser807 oldalláncokon foszforilált pRb-vel, míg a Thr821 és a Thr826 oldalláncon foszforilált formák nem kötődnek a PP1c-hez (Tamrakar és mtsai., 1999). Ugyanakkor a foszfo-Thr826 hatékonyan defoszforilálható a lizátumból immunprecipitációval nyert PP1 izoformákkal (Rubin és mtsai., 2001). Ezek a PP1c izoformák azonban valószínűleg holoenzim formájában vannak jelen a lizátumban. Ezzel összhangban gélszűréssel elválasztott sejtlizátumból PP1c-t immunprecipitálva 41 kDa, 110 kDa és 125 kDa kölcsönható fehérjék is kimutathatók a PP1c mellett a pRb-foszfatáz aktivitással rendelkező frakciókban (Nelson és mtsai., 1997). Az immunkomplexet alkotó regulátor alegység tehát aktiválhatja és a Thr826 oldalláncon foszforilált pRb-hoz irányíthatja a PP1c-t, jelezve ezzel, hogy a PP1 szabályzó alegységek jelentős szerepet tölthetnek be a pRb defoszforilációjának mechanizmusában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a MYPT1 regulátor alegységgel komplexet alkotva a PP1c sokkal hatékonyabban defoszforilálja a pRb-t, mint a PP1c önmagában, azaz a miozin foszfatáz holoenzim fontos szerepet játszhat *in vivo* is a pRb defoszforilációjában. SPR és immunprecipitációs kötődési adatok alapján a pRb a MYPT1-hez és a PP1c-hez is kötődik. A PP1c azonban a MYPT1-hez nagyobb affinitással kötődik, mint a pRb-hez, valamint az eredmények szerint a MYPT1 PP1c-kötő régiója hatékonyan leszorítja a PP1c-t a pRb

fehérjéről, ezáltal egy új PP1c-MYPT1-pRb komplex jöhet létre, amelyben a MYPT1 a PP1c-t olyan pozícióban rögzíti, hogy az a pRb defoszforilációja szempontjából kedvező legyen. A MP szerepét ezen kívül számos kísérletes bizonyíték támasztja alá: (a) a foszforilált pRb C-terminális fragmentumának defoszforilációját a tisztított MPH és a sejtizátumban jelen lévő holoenzim egyaránt hatékonyan katalizálja. (b) immunprecipitációval igazoltuk a pRb és MYPT1 fehérjék kölcsönhatását THP-1 sejtekben, és kimutattuk azt is, hogy mindkét fehérje főleg a sejtmagban lokalizálódik. (c) a pRb fehérje foszforilációs szintjének növekedése THP-1 sejtek CL-A-val történő kezelését követően összevethető mértékű a MP foszfatáz aktivitásának csökkenésével, amit a holoenzim gátló foszforilációs helyeinek (Thr695 és Thr850) foszforilációja okoz. Az utóbbi eredmény alapján feltételezhető, hogy a pRb foszforiláció szabályozása a MP foszforiláció-függő gátlásával valósulhat meg THP-1 leukémiás sejtekben. A MP aktivitásának foszforiláció-függő szabályozása jól ismert simaizom sejtek kontraktilis folyamataiban (Ito és mtsai., 2004; Hartshorne és mtsai., 2004). A MP aktivitásának módosítása a CL-A által közvetve, a PP2A gátlása révén valósulhat meg. 50 nM CL-A kezelés a PP2A enzim teljes gátlását okozza, ugyanakkor egyes megfigyelések szerint közvetlenül a PP1-et legfeljebb kisebb mértékben gátolhatja (Yan és mtsai., 1999). A feltételezett mechanizmus szerint a CL-A növeli a MYPT1-et foszforiláló kinázok aktivitását és/vagy gátolja a defoszforilációt végző foszfatázok működését. A PP2A gátlása elfogadható magyarázat lehet a Thr695 és Thr850 oldalláncok CL-A által kiváltott foszforilációjára, mivel *in vitro* kísérletek alapján a PP2A katalizálhatja ezen oldalláncok defoszforilációját (Takizawa és mtsai., 2002b). Munkacsoportunk jelen dolgozatban ismertetett és korábban bemutatott eredményei szerint CL-A kezelés simaizom sejtekben, míg okadánsav HepG2 sejtekben (Lontay és mtsai., 2005) egyaránt a MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek fokozott foszforilációját okozza, feltételezhetően a PP2A enzim gátlása révén.

Eredményeink alátámasztják, hogy a pRb MP általi defoszforilációja során a MYPT1 regulátor fehérjeként részt vesz a PP1c szubsztráthoz történő irányításában és módosítja annak aktivitását is. SPR vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy a pRb-C a MYPT1 N- és C-terminális szakaszaihoz egyaránt kötődhet *in vitro*, bár a MYPT1 C-terminális részével való kölcsönhatás fiziológiai jelentősége nem ismert. A célirányítás folyamatában elsősorban a MYPT1 N-terminális szakaszának lehet jelentős szerepe. A MYPT1 N-terminális szakaszára specifikus anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest csökkenti a MP aktivitását pRb szubsztráttal (hasonló mértékben, mint az MLC20 szubsztrát esetén), feltehetőleg a MYPT1 és PP1c közötti kölcsönhatás disszociációjával. Ez a jelenség összhangban van munkacsoportunk azon korábbi megállapításával, hogy a MYPT1 1-296 peptidszakasza nélkülözhetetlen a PP1c-vel

való kölcsönhatásban (Tóth és mtsai., 2000b). Felülrétegzési vizsgálatok alapján a pRb-vel való kölcsönhatásban a MYPT1 központi része, a 301-511 peptidszakasz felelős (Wu és mtsai., 2005), tehát nem valószínű, hogy az anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitest a MYPT1-pRb közötti kapcsolat megbontása révén fejtené ki gátló hatását. A MYPT1 és pRb közötti közvetlen kölcsönhatással összhangban, mindkét fehérje a THP-1 sejtek sejtmagjában található, ahol részleges kolokalizációt is mutatnak. Míg a pRb jellemzően a sejtmagban lokalizálódik, a MYPT1 általában megoszlik a sejtekben a citoszol és a sejtmag között (Murata és mtsai., 1997; Lontay és mtsai., 2004; Lontay és mtsai., 2005). A MYPT1 sejtmagi lokalizációját számos körülmény befolyásolhatja. A PP1 δ izoformájával asszociált MYPT1 elsősorban a citoszolban található, a sejtmagban igen kis mennyiségben fordul elő (Eto és mtsai., 2005). Növekedési faktorok jelenléte szintén hatással van a MYPT1 sejten belüli lokalizációjára: szérumbélesztett sejtekben a MYPT-GFP fehérje a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt megtalálható, míg szérumbélesztésben a MYPT-GFP főleg a sejtmagban lokalizálódik (Wu és mtsai., 2005). Ez ellentétben áll saját megfigyeléseinkkel, miszerint szérumbélesztett THP-1 sejtekkel végzett kísérleteink során a MYPT1 kizárólagos sejtmagi lokalizációját mutattuk ki kontroll és DNR-kezelt sejteken, konfokális mikroszkóppal és a szubcelluláris frakciók Western blot analízisével. Eredményeink szerint a PP1 δ , α és γ 1 izoformák nemcsak a citoszolban, hanem a sejtmagban is előfordulhatnak. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a MP a kezeletlen THP-1 sejtek sejtmagjában koncentráltan, és feltehetőleg aktív formában van jelen, hiszen a MYPT1 regulátor alegység aktivitását szabályozó gátló foszforilációs helyek csak kis mértékben vannak foszforilálva. Ennek ellenére kezeletlen THP-1 sejtekben a pRb Thr826 oldalláncának viszonylag magas alapfoszforilációját látjuk, ami meglepő aktív MP jelenlétében. Lehetséges, hogy a MYPT1 foszforilációján kívül más tényezők is befolyásolhatják a MP aktivitását és/vagy szerepet játszhatnak a pRb foszforilációs szintjének kialakításában. A CPI-17, egy a MP szabályozásában jelentős gátló fehérje fokozott expresszióját mutatták ki számos daganatos sejtvonalban, ami a MP csökkent aktivitását okozhatja (Jin és mtsai., 2006). További vizsgálatokat igényel annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a CPI-17-nek lehet-e ilyen szerepe THP-1 sejtek MP aktivitásának gátlásában.

Kísérleteink szerint a foszfatáz aktivitás CL-A-val kiváltott gátlása következtében a MYPT1 és pRb fehérjék a sejtmagból a citoplazmába transzlokálódnak. A MYPT1 transzlokációja attól függetlenül megtörténik, hogy a CL-A-t DNR-rel együtt vagy anélkül alkalmazzuk, míg pRb esetén csak CL-A jelenlétében figyelhető meg a fehérje kiáramlása a sejtmagból. A pRb eltérő viselkedésének oka nem tisztázott. Feltételezhető, hogy a sejtmag és

citoplazma közötti vándorlás mindkét fehérje esetén a CL-A jelenlétében kialakuló magasabb foszforiláltsági fok következménye. A CDK4 kináz túlzott működése a pRb hiperfoszforilációját váltja ki, aminek eredményeképp a pRb a sejtmagból a citoszolba transzlokálódik (Jiao és mtsai., 2006). Eredményeink szerint a CL-A kezelést fokozott CDK4 kináz aktivitás követi, amit a Thr826 oldallánc (egy CDK4 foszforilációs hely) foszforilációjának emelkedése mutat. Ugyanakkor a pRb^{pT826} CL-A távollétében a sejtmagban található, jelezve, hogy a pRb sejtmag és citoplazma közötti vándorlása független ezen oldallánc foszforilációs állapotától. Feltehető, hogy a fehérje C-terminális régiójában található, eddig nem azonosított Ser/Thr oldalláncok CDK általi foszforilációja játszhat szerepet a pRb és az Exportin 1 közötti kölcsönhatás kialakulásában és a pRb nukleáris exportjában (Jiao és mtsai., 2006). A CL-A szerepe a pRb citoplazmába történő kijutásában úgy értelmezhető, hogy a kialakuló foszfatáz gátlás a kináz/foszfatáz egyensúly megbontása révén olyan oldalláncok foszforilációját idézi elő, amelyek részt vesznek a pRb lokalizációjának szabályozásában. Hasonló mechanizmus feltételezhető a MYPT1 sejtmag és citoplazma közötti megoszlásának szabályozásában is. Eredményeink szerint a CL-A kezelés hatására jelentősen nő a MYPT1 gátló foszforilációs helyeinek, a Thr695 és Thr850 oldalláncoknak, a foszforilációja. Irodalmi adatokból ismert, hogy a MYPT1 sejtmagi transzportjában az N-terminális régióknak van kitüntetett szerepe (Wu és mtsai., 2005; Eto és mtsai., 2005), így nem valószínű, hogy a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja hatással lenne a fehérje lokalizációs mintázatára. A MYPT1 sejtmagba történő bejutását az N-terminális peptidszakasz és a konszenzus PP1c-kötő motívum között elhelyezkedő (27-33 aminosavak) nukleáris lokalizációs szignál szekvencia teszi lehetővé (Wu és mtsai., 2005; Eto és mtsai., 2005). CL-A hatására vélhetően a gátló foszforilációs helyek mellett más Ser/Thr oldalláncok is foszforilálódnak, amelyek szerepet játszanak a sejtmag és citoplazma közötti transzportfolyamatok szabályozásában. CL-A jelenlétében a MYPT1 fehérje lassabb vándorlása figyelhető meg SDS-poliakrilamid gélen. Korábbi vizsgálataink szerint a gátló foszforilációs helyek foszforilációja önmagában nem módosítja a MYPT1 mozgékonyágát SDS-PAGE analízis során (Lontay és mtsai., 2005; Murányi és mtsai., 2005). A fenti jelenség tehát tovább erősíti azt a feltételezést, hogy THP-1 sejtekben a gátló foszforilációs helyeken kívül más oldalláncok is foszforilálódnak CL-A hatására. Eredményeink szerint a MYPT1 a sejtmagból a citoplazmába transzlokálódik CL-A hatására, ugyanakkor a különböző PP1c izoformák sejten belüli eloszlása változatlan marad, ami összhangban van más munkacsoportok azon megfigyelésével, hogy a MYPT1 mozgása a sejtmag és a citoplazma között a PP1c katalitikus alegységről való disszociáció után mehet végbe (Eto és mtsai.,

2005). További kísérletek szükségesek annak eldöntésére, hogy a MYPT1 nukleáris lokalizációs szignálja és PP1c-kötőmotívuma közelében lévő foszforilációs hely(ek) szerepet játszanak-e a MYPT1 sejtmagi transzportjában és a PP1c-vel való kölcsönhatás szabályozásában.

Tannin alkotórészek foszfatázgátló hatása

A tannin keverékek számos enzim aktivitását képesek befolyásolni (Bode és Dong, 2004), protein foszfatázokat gátló tulajdonságaikat azonban először laboratóriumunkban mutattuk ki (Erdélyi és mtsai., 2005). E kísérletek folytatásaként tanulmányoztuk két fő tannin alkotórész, a penta-O-galloil-D-glükóz (PGG) és az epigallokatekin-3-gallát (EGCG), foszfatázgátló tulajdonságát és ezek szerkezet-hatás összefüggéseit. A PGG sokkal hatékonyabban gátolta a PP1c, mint a PP2Ac aktivitását, és az IC_{50} gátló koncentrációk a két enzimre több mint két nagyságrend különbséget mutatnak. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PGG megfelelően alacsony koncentráció tartományban alkalmas a PP1 és a PP2A aktivitások megkülönböztetésére *in vitro*, és legalább részleges gátló szelektivitást mutat a PP1c iránt magasabb koncentrációkban is. A PGG és EGCG, bár szerkezetük eltérő, közel azonos hatékonysággal gátolják a PP1c aktivitását és a PP1c-vel való kölcsönhatási paramétereik is hasonlóak. NMR szerkezeti vizsgálatok alapján az EGCG és a PGG aromás (hidrofób) gyűrűi, valamint a fenolos hidroxilcsoportjai vesznek részt a kölcsönhatás stabilizálásában. Ezzel összhangban kompetitív kötődési vizsgálataink is arra utaltak, hogy a PGG és EGCG kölcsönhatását a PP1c katalitikus centrumának hidrofób árkával kötődő molekulák (MC-LR, OA) jelentős mértékben gátolják. Mindezen szerkezeti tényezők, valamint számítógépes molekula-dokkolási vizsgálatok arra utaltak, hogy az EGCG és a PGG a PP1c hidrofób árkához kötődve, a szubsztrátmolekula hidrofób peptidszakaszával versenyezve fejtheti ki gátló hatását.

Eredmények azt sugallják, hogy a tannin alkotórészek a PP1c-t gátló molekulák új családját alkotják. Az eddig széleskörűen alkalmazott foszfatázgátló toxinok gátló hatásának közös szerkezeti magyarázata azoknak az enzim hidrofób árkához való kötődése. Ez a kölcsönhatás azonban önmagában nem elégséges hatékony gátlás kialakításához, és a gátlás fokozásához további régiókhoz (a foszfátot hidrolizáló és fémionokat is tartalmazó, a β 12- β 13 hurok régiók és hidrogénkötést kialakító oldalláncok) történő kötődést is feltételeztek (Colby és mtsai., 2003). A PGG gátló hatását a fémionok jelen- vagy távolléte nem befolyásolta, és a PGG és az EGCG kis méretéből adódóan nem valószínű, hogy a hidrofób árokhoz való kötődést követően a molekula egyes szerkezeti részei a foszfátot

hidrolizáló, vagy a β 12- β 13 hurok régiók közelébe kerülne. A tannin alkotórészek tehát a hidrofób árokhoz való kötődés és hidrogénkötések kialakításával fejtik ki gátló hatásukat. Feltehetően ennek tulajdonítható, hogy gátló hatásukat a toxinokhoz viszonyítva mintegy ezerszeres koncentrációban fejtik ki.

A PGG és az EGCG eltérően befolyásolják a leukémiás sejtek életképességét. Mindkét molekula a sejthalált indukál, ebben azonban a PGG sokkal hatékonyabbnak tűnik, mint az EGCG hasonló koncentrációknál. A különböző hatások molekuláris magyarázata, valamint ennek a foszfatázgátló hatással való kapcsolata még feltáráásra vár. Korábbi eredményeink szerint a galloytannin növelte a JNK kináz foszforilációját A549 sejtekben, és ez elősegítheti az apoptotikus folyamatok indukcióját (Erdélyi és mtsai., 2005). Előzetes, de még megerősítésre váró, kísérleteink szerint a PGG szintén növeli a JNK foszforilációját THP-1 leukémiás sejtekben, míg az EGCG e tekintetben hatástalan. Ez utóbbi jelenség magyarázata az lehet, hogy az EGCG-nek feltehetően több intracelluláris célponja van és ezekhez való kötődése esetleg a foszfatázgátlást ellensúlyozó hatásokat is eredményezhet (Umeda és mtsai., 2008).

Összegezve, a tannin alkotórészek, a foszfatázgátló toxinok mellett, a protein foszfatázhoz kötődő és gátló molekulák új családját alkotják. Kötődési és gátló mechanizmusuk feltárása azért jelentős, mert a toxinokkal ellentétben egyszerűbb szerkezettel bírnak, ezért kémiai szintézissel történő előállításuk, valamint szerkezeti módosításuk lehetővé teheti új, hatékony, farmakológiai szempontból is fontos foszfatázgátló molekulák előállítását.

ÖSSZEFOGLALÁS

A protein foszfatáz-1 (PP1) számos sejtfolymat szabályozásában vesz részt a fehérjék foszfo-Ser/Thr oldalláncainak defoszforilációja által. Kísérleteink során a miozin foszfatáz (MP) holoenzimet vizsgáltuk, amelyben a PP1 katalitikus alegység (PP1c) 110-130 kDa miozinnal is kölcsönható alegységhez (MYPT1) kapcsolódik. Célunk az volt, hogy tanulmányozzuk, hogyan befolyásolja a PP1 aktivitását a regulátor alegység foszforilációja, ennek milyen jelentősége lehet a sejtek életképességének szabályozásában. Vizsgáltuk továbbá, a PP1c-t gátló tannin komponensek szerkezet-hatás összefüggéseit.

Kimutattuk, hogy a Rho-asszociált kináz (ROK) a MYPT1 Thr695 mellett a Thr850 oldallánc foszforilációját is katalizálja, és ez a foszforiláció is a foszfatáz aktivitás gátlását eredményezi. A Thr850 oldalláncának ROK általi foszforilációja simaizom sejtekben fiziológiás (pl. lizofoszfatisav kezelés) és patológiás (foszfatázgátló kalikulin-A (CL-A) toxinnal történő kezelés) körülmények között is lejátszódik, és ez az enzim új, különböző jelátviteli útvonalak által megvalósuló szabályozási lehetőségét veti fel.

A CL-A alkalmazásával igazoltuk, hogy a PP1 és PP2A enzimek fontos szerepet játszanak a leukémiás sejtek életképességének szabályozásában. A CL-A mérsékli a daunorubicin (DNR) által indukált sejthalál mértékét, amelynek háttérében a retinoblasztóma fehérje foszforilációjának fokozódása és DNR által indukált degradációjának csökkenése áll. Kimutattuk, hogy a MP-nek jelentős szerepe lehet a pRb defoszforilációjában, amelyben a MYPT1 alegység töltheti be a PP1c-t „célra irányító” szerepet. A sejtek CL-A kezelése a MP MYPT1 alegysége gátló hatású foszforilációját, valamint a MYPT1-nek a sejtmagból a citoplazmába történő transzlokációját indukálja. A MP tehát a pRb defoszforilációja által részt vehet a sejtciklus és a leukémiás sejtek kemorezisztenciájának szabályozásában is.

Eredményeink szerint tannin alkotórészek, a penta-O-galloil-D-glükóz (PGG) és az epigallokatekin-3-gallát (EGCG), gátolják a protein foszfatázok aktivitását és a PP1c részlegesen szelektív gátlószerének tekinthetők. A PP1c δ izoenzimnek a PGG-vel és EGCG-vel való kölcsönhatását felületi plazmon rezonancián alapuló és NMR kötődési vizsgálatokkal, valamint számítógépes modellezéssel tanulmányoztuk, és arra következtetünk, hogy ezek a molekulák a PP1c aktív centrumának hidrofób zsebéhez kötődve fejtik ki gátló hatásukat. A PGG a daganatos sejtek életképességét nagyobb mértékben csökkentette, mint az EGCG. A tannin alkotórészek a protein foszfatázt gátló molekulák új családját alkotják, ezért kémiai szintézissel történő szerkezeti módosításuk lehetővé teheti új, farmakológiai szempontból is fontos foszfatázgátló molekulák előállítását.

SUMMARY

Protein phosphatase-1 (PP1) is involved in the regulation of numerous cellular processes by dephosphorylation of phospho-Ser/Thr side chains in proteins. We studied the myosin phosphatase (MP) holoenzyme in which PP1 catalytic subunit (PP1c) is associated with a 110-130 kDa regulatory subunit, termed myosin phosphatase target subunit (MYPT1). Our aims were to investigate how the phosphorylation of MYPT1 subunit influences PP1 activity and what could be the significance of this phosphorylation in the control of cell viability. In addition, we studied the role of PP1c binding tannin components in the regulation of phosphatase activity.

We show that Rho-associated kinase (ROK), beside Thr695 in MYPT1, also phosphorylates Thr850, and this phosphorylation (similarly to Thr695) results in inhibition of the phosphatase activity. Phosphorylation of Thr850 in MYPT1 by ROK occurs in smooth muscle cells under physiological (i.e. stimulation by lisophosphatidic acid, LPA) or pathological (i.e. treatment with calyculin-A (CL-A), a phosphatase inhibitory toxin) conditions and this phosphorylation may represent a novel regulatory mechanism in the control of MP activity by various signalling pathways.

Treatment of leukemic cells with CL-A proved that PP1 and PP2A enzymes play important roles in the regulation of cell viability. CL-A attenuates the extent of daunorubicin (DNR) induced cell death and this effect is accompanied with increased phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) and its decreased DNR-induced degradation. We proved that MP is involved in the dephosphorylation of pRb, and MYPT1 targets the PP1c to the pRb substrate. CL-A treatment of the cells resulted in inhibitory phosphorylation and translocation of MYPT1 from the nucleus to the cytoplasm. It is concluded that MP, by dephosphorylation of pRb, is implicated in the regulation of both the cell cycle and the chemoresistance of leukemic cells.

Our results imply that tannin components such as penta-O-galloyl-D-glucose (PGG) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), inhibit the activity of protein phosphatases and they are partially selective inhibitors of PP1c. The interaction of PP1c δ with PGG or EGCG are studied by surface plasmon resonance and NMR based binding experiments, as well as by computer based molecular modelling, and it is concluded that these molecules exert their inhibitory effect by binding to the hydrophobic groove of the PP1c catalytic centre. PGG treatment decreases the viability of tumor cells more profoundly than does EGCG. The tannin components represent a new family of phosphatase inhibitory compounds and their structural modifications by chemical synthesis may result in the development of pharmacologically important phosphatase inhibitory molecules.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, 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**, 1881-1886.
2. Alessi DR, Street AJ, Cohen P, Cohen PT (1993) Inhibitor-2 functions like a chaperone to fold three expressed isoforms of mammalian protein phosphatase-1 into a conformation with the specificity and regulatory properties of the native enzyme. *Eur J Biochem*, **213**, 1055-1066.
3. Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P (1992) The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *European Journal of Biochemistry*, **210**, 1023-1035.
4. Allen PB, Kwon YG, Nairn AC, Greengard P (1998) Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J Biol Chem*, **273**, 4089-4095.
5. Alvarado-Kristensson M, Andersson T (2005) Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *J Biol Chem*, **280**, 6238-6244.
6. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K (2000) Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research*, **261**, 44-51.
7. Andreassen PR, Lacroix FB, Villa-Moruzzi E, Margolis RL (1998) Differential Subcellular Localization of Protein Phosphatase-1 alpha, gamma 1, and delta áIsoforms during Both Interphase and Mitosis in Mammalian Cells. *J Cell Biol*, **141**, 1207-1215.
8. Ayllon V, Cayla X, Garcia A, Roncal F, Fernandez R, Albar JP, Martinez A, Rebollo A (2001) Bcl-2 Targets Protein Phosphatase 1{{alpha}} to Bad. *J Immunol*, **166**, 7345-7352.
9. Baxter GD, Lavin MF (1992) Specific protein dephosphorylation in apoptosis induced by ionizing radiation and heat shock in human lymphoid tumor lines. *J Immunol*, **148**, 1949-1954.
10. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*, **14**, 159-169.
11. Bode AM, Dong Z (2004) Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **555**, 33-51.
12. Boudreau RTM, Conrad DM, Hoskin DW (2007) Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. *Cellular Signalling*, **19**, 139-151.

13. Broustas CG, Grammatikakis N, Eto M, Dent P, Brautigan DL, Kasid U (2002) Phosphorylation of the Myosin-binding Subunit of Myosin Phosphatase by Raf-1 and Inhibition of Phosphatase Activity. *J Biol Chem*, **277**, 3053-3059.
14. Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF (2007) INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *Iubmb Life* **59**, 419 -26.
15. Cao W, Mattagajasingh SN, Xu H, Kim K, Fierlbeck W, Deng J, Lowenstein CJ, Ballermann BJ (2002) TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta 1 and expressed in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, C327-C337.
16. Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2002) Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays*, **24**, 371-381.
17. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, Hannun YA (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **277**, 12587-12595.
18. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061.
19. Chen YH, Chen MX, Alessi DR, Campbell DG, Shanahan C, COHEN P, Cohen PTW (1994) Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Letters*, **356**, 51-55.
20. Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci*, **115**, 241-256.
21. Colby DA, Liu W, Sheppeck JE, Huang Hb, Nairn AC, Chamberlin AR (2003) A new model of the tautomycin-PP1 complex that is not analogous to the corresponding okadaic acid structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 1601-1605.
22. Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP (2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase. *Biochem J*, **367**, 517-524.
23. Dou QP, An B, Will PL (1995) Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G1 arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9019-9023.
24. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **302**, 186-192.
25. Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, **7**, 555-569.

26. Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P, Barford D (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol*, **254**, 942-959.
27. Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P, Barford D (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J*, **16**, 1876-1887.
28. Endo S, Zhou X, Connor J, Wang B, Shenolikar S (1996) Multiple Structural Elements Define the Specificity of Recombinant Human Inhibitor-1 as a Protein Phosphatase-1 Inhibitor. *Biochemistry*, **35**, 5220-5228.
29. Erdélyi K, Kiss A, Bakondi E, Bai P, Szabó C, Gergely P, Erdődi F, Virág L (2005) Gallotannin Inhibits the Expression of Chemokines and Inflammatory Cytokines in A549 Cells. *Mol Pharmacol*, **68**, 895-904.
30. Erdődi F, Kiss E, Walsh MP, Stefansson B, Deng JT, Eto M, Brautigan DL, Hartshorne DJ (2003) Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 382-387.
31. Erdődi F, Tóth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P (1995) Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *Am J Physiol*, **269**, C1176-C1184.
32. Eto M, Kirkbride JA, Brautigan DL (2005) Assembly of MYPT1 with protein phosphatase-1 in fibroblasts redirects localization and reorganizes the actin cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, **62**, 100-109.
33. 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**, 356-360.
34. Eto M, Kitazawa T, Brautigan DL (2004) Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8888-8893.
35. 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**, 1104-1107.
36. Favre B, Turowski P, Hemmings BA (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**, 13856-13863.
37. Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **274**, 37385-37390.

38. Fernandez JJ, Candenas ML, Souto ML, Trujillo MM, Norte M (2002) Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*, **9**, 229 -262.
39. Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M (1998) A New Isoform of Human Myosin Phosphatase Targeting/Regulatory Subunit (MYPT2): cDNA Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Mapping. *Genomics*, **49**, 59-68.
40. Gergely P, Erdődi F, Bot G (1984) Heparin inhibits the activity of protein phosphatase-1. *Febs Lett*, **169**, 45 -48.
41. Goldberg J, Huang H-B, Kwon Y-G, Greengard P, Nairn A, Kuriyan J (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*, **376**, 745-753.
42. Hamaguchi T, Ito M, Feng J, Seko T, Koyama M, Machida H, Takase K, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an Inhibitor of Myosin Phosphatase, by Protein Kinase N. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**, 825-830.
43. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F (2004) Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **279**, 37211 -37214
44. Hayashi Y, Senba S, Yazawa M, Brautigan DL, 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**, 39858-39863.
45. Helps NR, Luo X, Barker HM, Cohen PT (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem J*, **349**, 509-518.
46. Hemmings HC, Jr., Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, **310**, 503-505.
47. Hersch E, Huang J, Grider JR, Murthy KS (2004) Gq/G13 signaling by ET-1 in smooth muscle: MYPT1 phosphorylation via ETA and CPI-17 dephosphorylation via ETB. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C1209-C1218.
48. Hirano K, Hirano M, Kanaide H (2004) Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*, **40**, 219-236.
49. Hirano K, Phan B, Hartshorne D (1997) Interactions of the Subunits of Smooth Muscle Myosin Phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 3683-3688.
50. Huang FL, Glinsmann WH (1976) Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*, **70**, 419-426.

51. Ichikawa K, Hirano K, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Hartshorne DJ (1996a) Interactions and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry*, **35**, 6313-6320.
52. Ichikawa K, Ito M, Hartshorne DJ (1996b) Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, **271**, 4733-4740.
53. Ingebritsen TS, Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*, **221**, 331-338.
54. Inomata M, Saijo N, Kawashima K, Kaneko A, Fujiwara Y, Kunikane H, Tanaka Y (1995) Induction of apoptosis in cultured retinoblastoma cells by the protein phosphatase inhibitor, okadaic acid. *J Cancer Res Clin Oncol*, **12**, 729-38.
55. Ito K, Shimomura E, Iwanaga T, Shiraishi M, Shindo K, Nakamura J, Nagumo H, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y (2003) Essential role of rho kinase in the Ca²⁺ sensitization of prostaglandin F₂α-induced contraction of rabbit aortae. *J Physiol*, **546**, 823-836.
56. Ito M, Feng J, Tsujino S, Inagaki N, Inagaki M, Tanaka J, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Nakano T (1997) Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry*, **36**, 7607-7614.
57. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*, **259**, 197-209.
58. Jagiello I, Beullens M, Vulsteke V, Wera S, Sohlberg B, Stalmans W, von Gabain A, Bollen M (1997) NIPP-1, a Nuclear Inhibitory Subunit of Protein Phosphatase-1, Has RNA-binding Properties. *J Biol Chem*, **272**, 22067-22071.
59. Jiao W, Datta J, Lin HM, Dunder M, Rane SG (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of the retinoblastoma tumor suppressor protein via Cdk phosphorylation-dependent nuclear export. *J Biol Chem*, **281**, 38098-38108.
60. Jin H, Sperka T, Herrlich P, Morrison H (2006) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature*, **442**, 576-579.
61. Johnson D, Cohen P, Chen MX, Chen YH, Cohen PT (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**, 931-939.
62. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*, **147**, 1023-1038.
63. 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**, 2500-2505.

64. Kiss E, Muranyi A, Csontos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F (2002) Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J*, **365**, 79-87.
65. Kita A, Matsunaga S, Takai A, Kataiwa H, Wakimoto T, Fusetani N, Isobe M, Miki K (2002) Crystal Structure of the Complex between Calyculin A and the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1. *Structure*, **10**, 715-724.
66. Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *Embo J*, **15**, 7060-7069.
67. Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, Khalequzzaman M (2003) Phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca²⁺ sensitization in rabbit smooth muscle. *J Physiol*, **546**, 879-889.
68. Knudsen ES, Wang JYJ (1996) Differential Regulation of Retinoblastoma Protein Function by Specific Cdk Phosphorylation Sites. *J Biol Chem*, **271**, 8313-8320.
69. Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, Takase K, Hartshorne DJ, Nakano T (2000) Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *Febs Lett*, **475**, 197-200.
70. Kwon Y-G, Lee SY, Choi Y, Greengard P, Nairn AC (1997) Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 2168-2173.
71. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
72. Lee MR, Li L, Kitazawa T (1997) Cyclic GMP Causes Ca²⁺ Desensitization in Vascular Smooth Muscle by Activating the Myosin Light Chain Phosphatase. *J Biol Chem*, **272**, 5063-5068.
73. Liu CW, Wang RH, Berndt N (2006) Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation. *Mol Carcinog*, **45**, 648-656.
74. Liu CW, Wang RH, Dohadwala M, Schonthal AH, Villa-Moruzzi E, Berndt N (1999) Inhibitory phosphorylation of PP1alpha catalytic subunit during the G(1)/S transition. *J Biol Chem*, **274**, 29470-29475.
75. Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F (2005) Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal*, **17**, 1265-1275.
76. Lontay B, Serfözö Z, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F (2004) Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol*, **478**, 72-87.

77. Ludlow JW, Glendening CL, Livingston DM, DeCarprio JA (1993) Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 367-372.
78. MacDonald JA, Borman MA, Murányi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TAJ (2001a) Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2419-2424.
79. MacDonald JA, Eto M, Borman MA, Brautigan DL, Haystead TAJ (2001b) Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Letters*, **493**, 91-94.
80. MacKintosh C, Garton AJ, McDonnell A, Barford D, Cohen PTW, Tonks NK, Cohen P (1996) Further evidence that inhibitor-2 acts like a chaperone to fold PP1 into its native conformation. *FEBS Letters*, **397**, 235-238.
81. Magenta A, Fasanaro P, Romani S, Di Stefano V, Capogrossi MC, Martelli F (2008) Protein Phosphatase 2A Subunit PR70 Interacts with pRb and Mediates Its Dephosphorylation. *Mol Cell Biol*, **28**, 873-882.
82. Matsumura F Hartshorne DJ (2008) Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*, **369**, 149-156.
83. Mayer M Meyer B (1999) Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition*, **38**, 1784-1788.
84. Mayer M, Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 6108-6117.
85. Maynes JT, Bateman KS, Cherney MM, Das AK, Luu HA, Holmes CF, James MN (2001) Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, **276**, 44078-44082.
86. Meyer B Peters T (2003) NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie-International Edition*, **42**, 864-890.
87. Mitnacht S (2005) The retinoblastoma protein-from bench to bedside. *Eur J Cell Biol*, **84**, 97-107.
88. Mitnacht S (1998) Control of pRB phosphorylation. *Current Opinion in Genetics & Development*, **8**, 21-27.
89. Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, **26**, 870-881.
90. Morimoto Y, Ohba T, Kobayashi S, Haneji T (1997) The Protein Phosphatase Inhibitors Okadaic Acid and Calyculin A Induce Apoptosis in Human Osteoblastic Cells. *Experimental Cell Research*, **230**, 181-186.

91. Murányi A, Derkach D, Erdődi F, Kiss A, Ito M, Hartshorne DJ (2005) Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett*, **579**, 6611-6615.
92. Murányi A, Erdődi F, Ito M, Gergely P, Hartshorne DJ (1998) Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem J*, **330**, 225-231.
93. Murányi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, Erdődi F, Kiss E, Wu Y, Hartshorne DJ (2002) Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J*, **366**, 211 -216.
94. Murányi A, Zhang R, Liu F, Hirano K, Ito M, Epstein HF, Hartshorne DJ (2001) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Letters*, **493**, 80-84.
95. Murata K, Hirano K, Villa-Moruzzi E, Hartshorne DJ, Brautigan DL (1997) Differential localization of myosin and myosin phosphatase subunits in smooth muscle cells and migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*, **8**, 663-673.
96. Nakamura M, Ichikawa K, Ito M, Yamamori B, Okinaka T, Isaka N, Yoshida Y, Fujita S, Nakano T (1999) Effects of the Phosphorylation of Myosin Phosphatase by Cyclic GMP-dependent Protein Kinase. *Cellular Signalling*, **11**, 671-676.
97. Nelson DA, Krucher NA, Ludlow JW (1997) High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*, **272**, 4528-4535.
98. Niirō N, Ikebe M (2001) Zipper-interacting Protein Kinase Induces Ca²⁺-free Smooth Muscle Contraction via Myosin Light Chain Phosphorylation. *J Biol Chem*, **276**, 29567-29574.
99. Niirō N, Koga Y, Ikebe M (2003) Agonist-induced changes in the phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase and CPI17, two regulatory factors of myosin light chain phosphatase, in smooth muscle. *Biochem J*, **369**, 117-128.
100. Pan MH, Lin JH, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) Induction of apoptosis by penta-O-galloyl-beta-D-glucose through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Pharmacol*, **381**, 171 -183.
101. Parra M, Mahmoudi T, Verdin E (2007) Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev*, **21**, 638-643.
102. Qin J, Chen HG, Yan Q, Deng M, Liu J, Doerge S, Ma W, Dong Z, Wan-Cheng Li D (2008) Protein Phosphatase-2A Is a Target of Epigallocatechin-3-Gallate and Modulates p53-Bak Apoptotic Pathway. *Cancer Res*, **68**, 4150-4162.
103. Ren XD, Wang R, Li Q, Kahek LAF, Kaibuchi K, Clark RAF (2004) Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment. *J Cell Sci*, **117**, 3511-3518.

104. Rubin E, Mittnacht S, Villa-Moruzzi E, Ludlow JW (2001) Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1. *Oncogene*, **20**, 3776-3785.
105. Ruvolo PP (2001) Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways. *Leukemia*, **15**, 1153-1160.
106. Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T (2003) Activation of RhoA and Inhibition of Myosin Phosphatase as Important Components in Hypertension in Vascular Smooth Muscle. *Circ Res*, **92**, 411-418.
107. Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, . (1994) Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **269**, 30407-30411.
108. Shin HM, Je HD, Gallant C, Tao TC, Hartshorne DJ, Ito M, Morgan KG (2002) Differential Association and Localization of Myosin Phosphatase Subunits During Agonist-Induced Signal Transduction in Smooth Muscle. *Circ Res*, **90**, 546-553.
109. Skinner JA, Saltiel AR (2001) Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1. *Biochem J*, **356**, 257-267.
110. Somlyo AP, Somlyo AV (2003a) Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*, **83**, 1325-1358.
111. Somlyo AV, Phelps C, Dipierro C, Eto M, Read P, Barrett M, Gibson JJ, Burnitz MC, Myers C, Somlyo AP (2003b) Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *FASEB J*, **17**, 223-234.
112. Steen RL, Martins SB, Tasken K, Collas P (2000) Recruitment of Protein Phosphatase 1 to the Nuclear Envelope by A-Kinase Anchoring Protein AKAP149 Is a Prerequisite for Nuclear Lamina Assembly. *J Cell Biol*, **150**, 1251-1262.
113. Takai A, Bialojan C, Troschka M, Ruegg JC (1987) Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett*, **217**, 81-84.
114. Takizawa N, Koga Y, Ikebe M (2002a) Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **297**, 773-778.
115. Takizawa N, Niuro N, Ikebe M (2002b) Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. *FEBS Letters*, **515**, 127-132.
116. Tamrakar S, Ludlow JW (2000a) The carboxyl-terminal region of the retinoblastoma protein binds non-competitively to protein phosphatase type 1alpha and inhibits catalytic activity. *J Biol Chem*, **275**, 27784-27789.

117. Tamrakar S, Mittnacht S, Ludlow JW (1999) Binding of select forms of pRB to protein phosphatase type 1 independent of catalytic activity. *Oncogene*, **18**, 7803-7809.
118. Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW (2000b) Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci*, **5**, D121-D137.
119. Tan I, Ng CH, Lim L, Leung T (2001) Phosphorylation of a Novel Myosin Binding Subunit of Protein Phosphatase 1 Reveals a Conserved Mechanism in the Regulation of Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem*, **276**, 21209-21216.
120. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*, **429**, 780-784.
121. Tóth A, Kiss E, Gergely P, Walsh MP, Hartshorne DJ, Erdódi F (2000a) Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *Febs Lett*, **484**, 113 -117.
122. Tóth A, Kiss E, Herberg FW, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdódi F (2000b) Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem*, **267**, 1687-1697.
123. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, **150**, 797-806.
124. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hosoya H, Hartshorne DJ, Matsumura F (1999) Activation of Myosin Phosphatase Targeting Subunit by Mitosis-specific Phosphorylation. *J Cell Biol*, **144**, 735-744.
125. Umeda D, Yano S, Yamada K, Tachibana H (2008) Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate Signaling Pathway through 67-kDa Laminin Receptor. *J Biol Chem*, **283**, 3050-3058.
126. 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 Letters*, **527**, 101-104.
127. Wang RH, Liu CW, Avramis VI, Berndt N (2001) Protein phosphatase 1alpha-mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Oncogene*, **20**, 6111-6122.
128. Wang Z, Lanner MC, Jin N, Swartz D, Li L, Rhoades RA (2003) Hypoxia Inhibits Myosin Phosphatase in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells: Role of Rho-Kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **29**, 465-471.
129. Watanabe Y, Ito M, Kataoka Y, Wada H, Koyama M, Feng J, Shiku H, Nishikawa M (2001) Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase is involved in human platelet secretion. *Blood*, **97**, 3798-3805.

130. Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP (2005) Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J*, **389**, 763-774.
131. Wooldridge AA, MacDonald JA, Erdódi F, Ma C, Borman MA, Hartshorne DJ, Haystead TA (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**, 34496-34504.
132. Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP (1996) Cyclic GMP-Dependent Stimulation Reverses G-Protein-Coupled Inhibition of Smooth Muscle Myosin Light Chain Phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **220**, 658-663.
133. Wu Y, Murányi A, Erdódi F, Hartshorne DJ (2005) Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants. *J Muscle Res Cell Motil*, **26**, 123-134.
134. Wu Y, Erdódi F, Murányi A, Nullmeyer K, Lynch R, Hartshorne D (2003) Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **24**, 499-511.
135. Xin M, Deng X (2006) Protein Phosphatase 2A Enhances the Proapoptotic Function of Bax through Dephosphorylation. *J Biol Chem*, **281**, 18859-18867.
136. Yan Y, Mumby MC (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**, 31917-31924.
137. Yang CS, Maliakal P, Meng X (2002) Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **42**, 25-54.
138. Zarkowska T, Mittnacht S (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, **272**, 12738-12746.
139. Zhang ZJ, Bai G, Shima M, Zhao SM, Nagao M, Lee EYC (1993) Expression and Characterization of Rat Protein Phosphatases-1[alpha], -1[gamma]1, -1[gamma]2, and -1[delta]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **303**, 402-406.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdődi Ferenc egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, aki hozzáértő szakmai segítségével mindvégig egyengette utamat a kutatás rögs ösvényein.

Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, hogy munkámat támogatta, és lehetővé tette kísérleteim elvégzését a Debreceni Egyetem OEC Orvosi Vegytani Intézetében.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet (OVI) minden dolgozójának, hogy bármikor bátran fordulhattam hozzájuk segítségért. Köszönöm Dr. Németh Árpádnénak a mindennapos kísérletes munkámban való hatékony segítségét. Köszönöm munkacsoportunk tagjainak (Dr. Lontay Beáta, Bécsi Bálint, Dedinszki Dóra, Bátor Róbert) a nyugodt, baráti légkört, a hasznos konzultációkat. Köszönöm valamennyi OVI-s barátomnak az együtt töltött hallgatói évek során kapott biztatást és szakmai segítséget.

Köszönöm Prof. Dr. Oláh Éva (DE OEC Gyermekklinika) és Dr. Márkász László közreműködését a leukémiás sejtek kemorezisztenciájának vizsgálatában.

Köszönet Dr. E. Kövér Katalinnak (DE TEK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) az NMR-spektroszkópiás vizsgálatokért és Dr. Komáromi Istvánnak (DE OEC Klinikai Kutatóközpont) a molekulamodellezéseikért.

Köszönöm Dr. Csernoch Lászlónak, hogy hozzáférést biztosított DE OEC Élettani Intézet konfokális mikroszkópjához, és Dienes Beatrixnak a technika segítségét.

Hálás köszönettel tartozom szüleimnek, aki szeretetükkel végig támogattak tanulmányaim során. Köszönöm Ákosnak, aki türelmével és szeretetével ezernyi módon segítette munkámat.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kiss A, Lontay B, Bécsi B, Márkász L, Oláh E, Gergely P, Erdődi F.: 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**: 2059-2070. (2008) (IF: 4,887)

Murányi A, Derkach D, Erdődi F, **Kiss A**, Ito M, Hartshorne DJ.: Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett.* **579**: 6611-6115. (2005) (IF: 3,415)

Egyéb közlemények

Márkász L, Hajas G, **Kiss A**, Lontay B, Rajnavölgyi E, Erdődi F, Oláh E.: Granulocyte Colony Stimulating Factor Increases Drug Resistance of Leukaemic Blast Cells to Daunorubicin. *Pathol Oncol Res.* (2008) (közlés alatt) (IF: 1,241)

Lontay B, **Kiss A**, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdődi F.: Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal.* **17**: 1265-75. (2005) (IF: 5,19)

Erdélyi K, **Kiss A**, Bakondi E, Bai P, Szabó C, Gergely P, Erdődi F, Virág L.: Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol Pharmacol.* **68**: 895-904. (2005) (IF: 4,612)

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások:

Kiss A.: A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációjának szabályozásában. *Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, Debrecen, 2007

Kiss A, Lontay B, Márkász L, Oláh É, Gergely P, Erdődi F.: A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációjának szabályozásában. *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Pécs, 2006

Kiss A.: A miozin foszfatáz szabályozó alegység Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja Rho-kinázzal. *Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, Debrecen, 2006

Kiss A.: Miozin foszfatáz szabályozó alegység TAT transzdukciós doménnal kapcsolt N-terminális peptidjének transzdukciója sejtekbe. *Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia*, Debrecen, 2005

Poszterek:

Kiss A, Bécsi B, Kandra L, Gyémánt Gy, Erdődi F.: Tanninok foszfatázgátló hatásának vizsgálata. *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Szeged, 2008*

Kiss A, Lontay B, Márkász L, Oláh E, Gergely P, Erdődi F.: Targeting function of MYPT1 in the dephosphorylation of retinoblastoma protein. *EuroPhosphatases 2007, Protein Phosphatases in Health and Disease, Aveiro, Portugal, 2007*

Kiss A, Lontay B, Márkász L, Oláh E, Gergely P, Erdődi F.: Role of MYPT1 in dephosphorylation of retinoblastoma protein. *Bridges in Life Science, Annual Scientific Review Meeting of the Regional Cooperation for Health, Science and Technology Consortium, Pécs, 2007*

Kiss A, Lontay B, Márkász L, Oláh É, Gergely P, Erdődi F.: Foszfatazinhibitorok és a MYPT1 szerepe a retinoblasztóma fehérje defoszforilációjában. *Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, Debrecen, 2007*

Kiss A, Lontay B, Dedinszki D, Márkász L, Oláh É, Gergely P, Erdődi F.: A protein foszfatázok szerepe leukémiás sejtek életképességének és kemoszenzitivitásának szabályozásában. *37. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2007*

Kiss A, Lontay B, Márkász L, Oláh É, Gergely P, Erdődi F.: A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációjának szabályozásában. *VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007*

Kiss A, Lontay B, Murányi A, Hartshorne DJ, Erdődi F.: A miozin foszfatáz szabályzó alegység Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja Rho-kinázzal. *36. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2006*

Kiss A, Lontay B, Erdődi F.: Miozin foszfatáz szabályzó alegység TAT transzdukciós doménnal kapcsolt N-terminális peptidjének transzdukciója sejtekbe. *VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005*

Kiss A, Kiss E, Hartshorne DJ., Erdődi F.: A miozin foszfatáz foszforilációja Rho-kináz és protein kináz-A enzimekkel. *Magyar Biokémiai Egyesület, II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész, 2003*