

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés

**PROTEIN FOSZFATÁZOK SZABÁLYOZÓ SZEREPE
LEUKÉMIÁS SEJTEK KEMOSZENZITIVITÁSÁBAN ÉS
KERATINOCITÁK PATOLÓGIÁS FOLYAMATAIBAN**

Dedinszki Dóra

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
BEVEZETÉS.....	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
Fehérje foszforiláció és defoszforiláció	9
A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása és jellemzése.....	10
A PP2A szerkezete	11
A PP1 szerkezete	12
A Ser/Thr foszfatázok gátlása természetes toxinokkal és inhibitor fehérjékkel	14
Inhibitor toxinok és szabályozó szerepük.....	14
Inhibitor fehérjék és szabályozó szerepük.....	15
A foszforiláció függő KEPI inhibitor fehérje	16
PP1 szerepe leukémiában.....	17
A retinoblasztóma fehérje (pRb).....	18
Az ultraibolya sugárzás.....	20
Az epidermisz felépítése	21
A keratinociták jellemzése	22
Melanóma kialakulása és foszfofehérjék szerepe	23
Melanóma marker fehérjék jellemzése	24
CÉLKITŰZÉSEK	26
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
Anyagok.....	27
Antitestek.....	27
Kemoterápiás szer (daunorubicin) és toxinok (kalikulin-A, okadánsav, tautomycin) szerkezete és hatásmechanismusuk	28
Sejttenyésztés.....	30
Sejtek kezelése és lízise	30
MCF-7 sejtek	31
HaCaT és NHEK sejtek	31
Fluoreszcens <i>in vitro</i> gyógyszerérzékenységi teszt	31
Western blot.....	32
Kaspáz-3 aktivitás mérés	32
Életképes, apoptotikus és nekrotikus sejtek detektálása Hoechst festékkel.....	33
LDH felszabadulás mérése	33
Metil-tiazol-tetrazólium teszt (MTT assay).....	34
Protein foszfatáz aktivitás meghatározása	34
Flag-KEPI vektor.....	35
Flag-KEPI transzfekció	35
panPP1c siRNS transzfekció	36
Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia.....	36
UV (UVA, UVB) besugárzás	37
Szubcelluláris frakciók készítése HaCaT sejtekből.....	37
Állatkísérletek.....	38
Immunhisztokémiai vizsgálatok	38
Egérbőr minták feltárása.....	39
RNS és microarray analízis adatok elemzése	39
Statisztikai elemzés.....	39
EREDMÉNYEK	40
Protein foszfatáz inhibitor toxinok és fehérjék hatása a leukémiás sejtek kemoszenszitivitására.....	40

Daunorubicin és protein foszfatáz inhibitorok hatása leukémiás sejtek kemoszenzitivitására.....	40
Leukémiás sejtek életképességének vizsgálata	40
Protein foszfatáz inhibitor toxinok szelektivitásának ellenőrzése THP-1 sejtekben	41
THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitása	42
A kezelések következtében bekövetkező sejthalál típusának vizsgálata	43
CLA, TM és DNR kezelés hatása a túlélésben/apoptózisban részt vevő fehérjék foszforilációjára.....	45
CLA és TM kezelés hatása PP1 inhibitor fehérjékre.....	46
KEPI fehérje szabályozó szerepének tanulmányozása a pRb fehérje foszforilációjára.....	48
THP-1 sejtek transzfekciója Flag-KEPI fehérjével	48
HeLa sejtek csendesítése siRNS technikával	48
MCF-7 sejtek transzfekciója Flag-KEPI plazmiddal	50
Flag-KEPI lokalizációjának megváltozása PMA kezelés hatására MCF-7 sejtekben.....	51
PMA által aktivált KEPI hatása a pRb foszforilációjára MCF-7 sejtekben.	53
CLA kezelés hatása a KEPI és pRb fehérjék foszforilációjára MCF-7 sejtekben.....	54
PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata HaCaT keratinocita sejtekben	55
PP1 katalitikus alegység izoformák azonosítása HaCaT sejtek frakcióiban.....	55
UV sugárzás dózisfüggő hatása a HaCaT sejtek életképességére és foszfatáz aktivitására	57
Protein foszfatáz inhibitor toxinok szelektivitásának ellenőrzése HaCaT sejtekben.....	58
PP1c csendesítés és UVA besugárzás hatása a PP1c izoformák expressziójára.....	59
PP1c csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek életképessége és foszfatáz aktivitása	60
NHEK és HaCaT sejtek apoptózisának vizsgálata	61
PP1 csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek microarray analízise és génontológiai elemzése.....	62
Keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziós változása PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően HaCaT sejtekben.....	65
A PP1c szabályozó szerepének vizsgálata keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára NHEK sejtekben	66
Keratin 1 lokalizációs változása HaCaT sejteken PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően.....	67
PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata Balb/c egereken	68
PP1 gátlás és UVA hatásának szövettani vizsgálata.....	69
PP1 gátlás és UVA besugárzás hatása a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára Balb/c egerekben.....	71
MEGBESZÉLÉS.....	73
PP1 és PP2A szerepe a sejtek életképességének szabályozásában	73
KEPI inhibitor fehérje hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára.....	74
PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata HaCaT keratinocita sejtekben	77
PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata Balb/c egerekben.....	79
ÖSSZEFOGLALÁS	81
SUMMARY	82
IRODALOMJEGYZÉK.....	83
TÁRGYSZAVAK.....	94
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	95
FÜGGELÉK.....	96

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

64PP	(6-4)-fototermék
ACTH	adenokortikotróp hormon
Akt	protein kináz B (PKB)
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BSA	borjú szérum albumin
cAMP	ciklikus AMP
CDK	ciklin-függő kináz
CDKN2A	CDKN2A - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gén
CDKN2B	CDKN2B - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gén
CLA	kalikulin-A
CPD	ciklobután pirimidin dimer
CPI-17	17kDa PKC által aktivált inhibitor
DARP-32	32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszoprotein
DMEM	Dubelco Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNR	daunorubicin
DTT	ditioteritol
E1A	adenovírus 1A korai fehérje
E2F	eukarióta transzkripció faktor
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL	nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló reagens
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FBS	újszülött borjú szérum
FCP	aszpartát alapú foszfatázok
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
GM-CSF	granulocita-makrofág stimuláló faktor
H1b	hiszton 1b fehérje
HaCaT	humán keratinocita
HeLa	méhnyakrák karcinóma sejtek
HGF	hepatocita növekedési faktor
HRP	torma peroxidáz
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
IC ₅₀	50 %-os enzimaktivitás csökkenést okozó koncentráció
ILK	integrin-linked kinase
KEPI	protein kináz C aktivált gátló fehérje
KIVIF	stockholmi Karolinska Intézet
KG-1	myeloid leukémiás sejtvonal
KRT1	keratin 1 fehérje
KRT10	keratin 10 fehérje
LB	Luria-Bertani tápoldat
LIF	leukémia gátló faktor
M20	a miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége
MCF-7	humán emlő adenocarcinoma
MC-LR	mikrocisztin-LR
MC1R	melanokortin-1 receptor

MDM2	murine double minute 2
ME	β -merkapto-etanol
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MITF	microphthalmia-asszociált transzkripció faktor
MLC20	miozin 20 kDa könnyű lánc
MP	miozin foszfatáz
MPH	miozin foszfatáz holoenzim
MSH	melanocita stimuláló hormon
MTT	Metil-tiazol-tetrazólium
MYPT	miozin foszfatáz szabályozó alegység
NEAA	nem esszenciális aminosavak
NLS	sejtmagi lokalizációs szignál
OA	okadánsav
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	foszfát puffer
PHI-1	foszfatáz holoenzim inhibitor
PFA	paraformaldehid
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PKG	protein kináz G
PMA	forbol 12-mirisztát 13-acetát
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
POMC	proopiomelanokortin
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz katalitikus alegység
PP2A	protein foszfatáz-2A
PP2B	protein foszfatáz-2B
PP2C	protein foszfatáz-2C
PPM	fémion-függő protein foszfatázok
PPP	foszfoprotein foszfatázok
pRb	retinoblasztóma fehérje
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
ROK	RhoA által aktivált kináz
ROS	reaktív oxigén gyökök
S100A8	kalcium-kötő fehérje A8
SDS	nátrium-dodecilszulfát
siRNA	kis interferáló RNS
TBS	Tris-HCl puffer
THP-1	humán monocita leukémiás sejtvonal
TM	tautomycin
TNF	tumor nekrosis faktor
UV	ultraibolya sugárzás

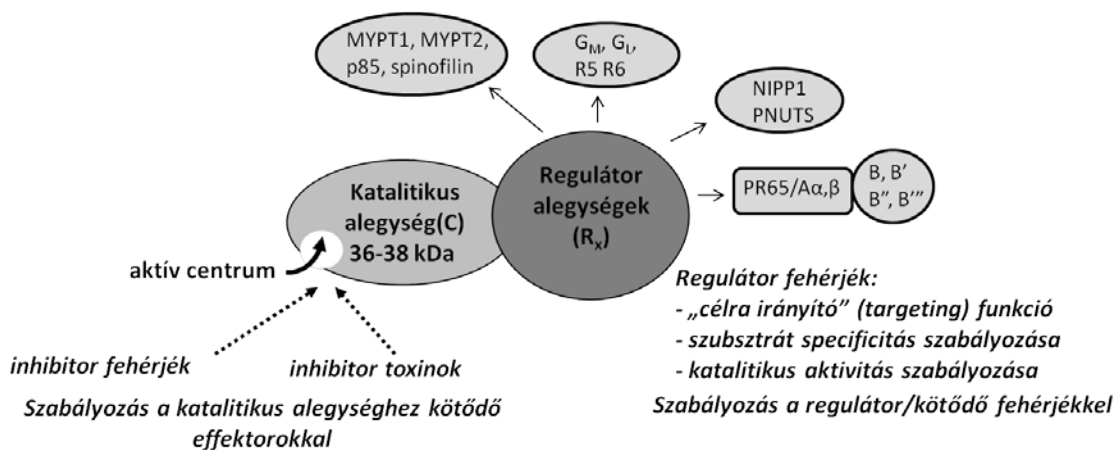
BEVEZETÉS

Az élő szervezetek számára elengedhetetlen a feleslegessé vált vagy a javíthatatlan sérülést szenvedett sejtek eltávolítása. Ekkor a sejtek jól szabályozott körülmények között beindítják a programozott sejthalált, azaz apoptózissal elpusztulnak.

Több útvonalon keresztül is indukálódhat apoptózis: (i) a sejt öregedése következtében önmaga indítja be; (ii) javíthatatlan sejtkárosodást követően és (iii) a sejt felszínén megtalálható halál-receptorokon keresztül. A sejthalált kiváltó külső és belső tényezők közül a belső (intrinszik) útvonal a stressz, tápanyag hiány, vírusfertőzés, intracelluláris kalcium szint emelkedés hatására bekövetkező membránkárosodás hatására aktiválódó kaspáz rendszeren keresztül megy végbe, amelyek a sejt morfológiai változásai előtt megkezdik a túléléshez szükséges fehérjék inaktiválását (pl. citoskeletális elemek, DNS javító enzimek, a tumor szupresszor retinoblasztóma fehérje, stb.) illetve a sejthalál folyamatában részt vevő fehérjék aktiválását (pl. endonukleázok, más kaspázok). A külső (extrinszik) útvonal beindulásában részt vehet például hormonok, növekedési faktorok, nitrogén monoxid vagy az aktivált falósejtek által termelt, 19 tagból álló tumor nekrozis faktor (TNF) család. A TNF molekulák a receptoraikhoz kapcsolódnak, majd a megfelelő fehérjék aktiválódnak, és végül bekapcsolódnak a kaspáz útvonalba (Wickremasinghe és Hoffbrand 1999). Érdeklődésünk középpontjában különféle tényezők, pl. daganatellenes szerek és UV sugárzás által kiváltott sejthalál állt. Egyre több tanulmány jelenik meg arról, hogy a leukémiás megbetegedések során megváltozik az apoptotikus jelátvitel, ami a sejtek megnövekedett túléléséhez vezet. Az onkológiában, az apoptózis célzott folyamatain keresztül ható kemoterápiás szerek egyre nagyobb figyelmet kapnak, hiszen a kemoterápiás kezeléseknél gyakran megfigyelhető a kemorezisztencia, ami a terápia sikertelenségét eredményezi. A kemorezisztencia létrejöttének okai közé tartoznak a multidrog-rezisztenciáért felelős (pl. P-glikoprotein) és antiapoptotikus fehérjék (pl. Bcl-2 fehérje család) megnövekedett expressziója, pro-apoptotikus útvonalak gátlása és túlélést elősegítő folyamatok aktiválása (Testa és Riccioni 2007; Reya és mtsia., 2001). Míg a daganatellenes szerek alkalmazásával a már kialakult rákos sejtek apoptózisának kiváltása a cél, addig az UV sugárzás hatására bekövetkező sejthalál indukálásával a szervezet önmaga védekezik a bőr daganatos megbetegedése ellen. A különböző UV sugárzások, pl. az UVA és UVB, biológiai hatása eltér, mivel az UVA főleg reaktív oxigén gyökök felszabadításával és kisebb mértékű DNS károsító hatásaival eredményez apoptózist, míg az UVB sugárzás főleg DNS töréseket, pirimidin dimereket, fototermékeket hoz létre (Schwarz és mtsai., 1995; Tadokoro és mtsai., 2003). Akár a belső,

akár az említett külső hatásokra bekövetkező apoptotikus jelátviteli útvonalakra közösen jellemző, hogy a pro- és antiapoptotikus faktorok foszforiláción/defoszforiláción keresztül módosulnak (Cheng és mtsai., 2013). A foszforilációért felelős protein kinázok szerepe jól ismert a daganatos folyamatokban, azonban keveset tudunk a protein foszfatázokról és az általuk szabályozott folyamatokról. Irodalmi adatok alapján a fehérjék foszforilációjának és defoszforilációjának hatása ellentmondásos, szenzitizációt és rezisztenciát is eredményezhet. Ezeknek a folyamatoknak a pontosabb megértéséhez elengedhetetlen a szerin/treonin specifikus foszfatázok közé tartozó protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) fehérjék szerepének tanulmányozása a külső hatások által kiváltott apoptózisban.

Az eukarióta sejtekben foszfo-Ser/Thr specifikus enzimek közül a legjelentősebbek a PP1 és PP2A enzimek. Általános szerkezetükre jellemző, hogy egy 36-38 kDa méretű katalitikus alegységből és egy vagy több regulátor alegységből állnak (1. ábra).



1. ábra Protein foszfatáz-1 és -2A enzimek általános szerkezete

A regulátor alegység adaptor és/vagy szubsztrátfehérjékhez történő kapcsolódásával képesek célra irányító (“targeting”) funkció ellátására, azaz a katalitikus alegységet a sejt megfelelő kompartmentjeihez irányítják. A szubsztrátnak a regulátor alegységhez való kötődése meghatározhatja a katalitikus alegység szubsztrátspecifitását. A regulátor alegység fő szerepe még, hogy foszforilációjával a katalitikus alegység aktivitását is szabályozza, ami akár gátlást, akár aktiválást is jelenthet. A katalitikus alegység aktivitásának szabályozása történhet membránpermeábilis inhibitor toxinokkal, vagy celluláris inhibitor fehérjéken keresztül is. A természetes eredetű toxinok közül az okadánsavnak, kalikulin-A-nak, mikrocisztinnek, tautomicinnek és tautomicetinnek jelentős szerepe van a PP1 és PP2A protein foszfatázok szerepének vizsgálatában, mivel koncentráció-függő módon szelektíven

gátolják ezeket az enzimeket. A foszforilációs és defoszforilációs folyamatoknak kitüntetett jelentősége van az extracelluláris stimulusokra (hormonok, mitogének, citokinek, stb.) adott válaszokban, így a protein kinázok mellett a foszfatázoknak is megkérdőjelezhetetlen szerepük van a sejtek működésének szabályozásában. Mivel ez a specifikus funkció még nem minden részletében tisztázott, így a foszfatázok toxinokkal való elkülönítése igen jelentős mértékben hozzájárul a tanulmányozásukhoz.

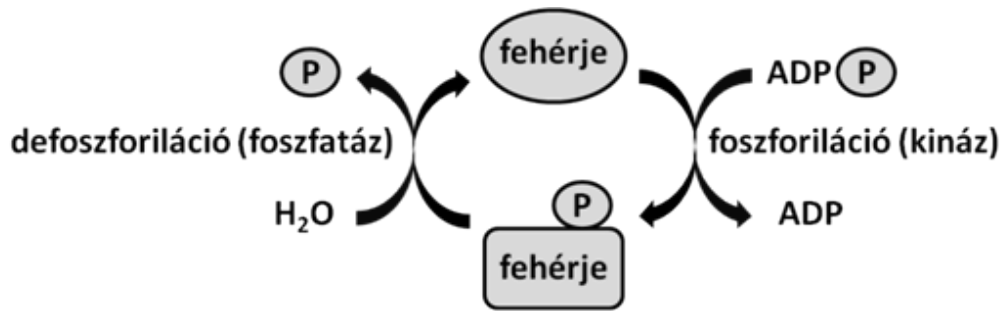
A protein foszfatázok gátlására alkalmas fehérjék közül először az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) fehérjéket fedezték fel (Huang és Glinsmann 1976). Az I-1 gátló képessége több százszorosára növelhető a Thr35 oldallánc PKA-val történő foszforilálásával. A további kutatásokban ez a PP1 protein foszfatázt gátló foszoprotein vált az inhibitor fehérjék prototípusává. Ily módon fedezték fel a DARPP-32 (32kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszoprotein) inhibitor fehérjét (Hemmings és mtsai., 1984), a CPI-17 (17 kDa PKC által aktivált inhibitor) inhibitor fehérjét (Eto és mtsai., 1997), és az általunk vizsgált KEPI (protein kináz C aktivált gátló fehérje) inhibitor fehérjét is (Liu és mtsai., 2002).

Mindezek tükrében célunk az volt, hogy a még kevésbé ismert foszforiláció függő KEPI gátló fehérje szerepét feltárjuk a celluláris és apoptotikus fehérjék foszforilációjában és ezáltal megállapítsuk a sejthalál indukálásában, ill. a túlélés elősegítésében betöltött funkcióját, különös hangsúlyt fordítva a retinoblasztóma (pRb) fehérje foszforiláltságának szabályozására. Ehhez THP-1 leukémiás sejtvonalat és a KEPI inhibitor fehérjét nem tartalmazó MCF-7 emlő tumor sejtvonalat használtunk modellként. Kimutattuk, hogy az aktivált KEPI fehérjének szerepe van a pRb fehérje foszforilációjának szabályozásában, így befolyásolja a sejtek túlélését. Tanulmányoztuk továbbá HaCaT keratinocita sejteken PP1 csendesítést és Balb/c egereken PP1 gátló tautomycin (TM) toxint alkalmazva, hogy az UV sugárzás hatására bekövetkező patológiás sejt- és bőrelváltozásokban milyen szerepe lehet a PP1 enzimesaládnak.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

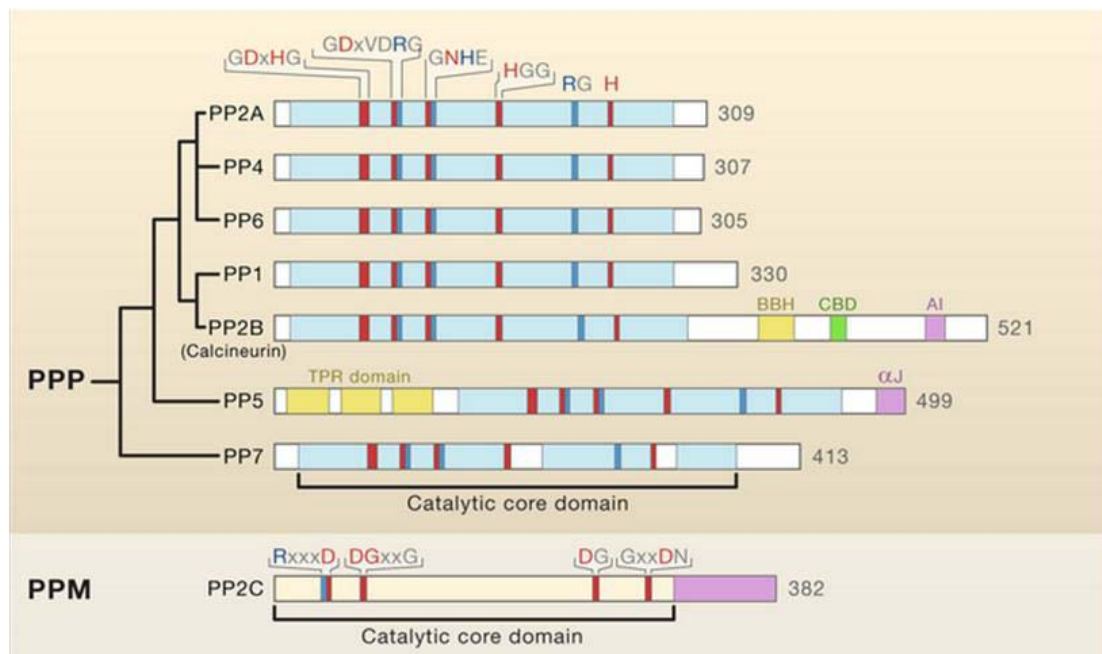
A fehérjék poszttranszlációs szabályozásának gyakran vizsgált lehetősége a reverzibilis kovalens módosítások közé tartozó foszforiláció, amelynek jelentőségére a glikogén-foszforilázt szabályozó foszforiláz kináz működésének vizsgálata mutatott rá az 1960-as évek közepén, a később Nobel-díjjal jutalmazott Edmond Fischer és Edwin Krebs munkássága nyomán. A reverzibilis foszforiláció kulcsfontosságú szerepére utal, hogy a metabolikus útvonalaktól kezdve a sejthalálon át számos sejt folyamatot szabályoz. A reakciót katalizáló enzimek a protein kinázok, amelyek foszfát csoportot építenek be a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncaiba, ezáltal befolyásolhatják például enzimek aktivitását és a fehérjék különböző funkcióját. A protein kinázok által katalizált foszforilációk több mint 90 %-a Ser/Thr oldalláncon zajlik (Olsen és mtsai., 2006). A Ser/Thr-kinázok az alifás aminosav oldallánc hidroxil csoportjával, míg a Tyr-kinázok pedig a Tyr aromás aminosav oldallánc hidroxil csoportjával létrejövő foszfoészter kötés kialakulását katalizálják. A reakció visszafordíthatóságát a protein foszfatázok biztosítják, amelyek a kinázok által kialakított foszfoészter kötést hidrolizálják (2. ábra). Mivel az eukarióta sejtek összes fehérjéinek kb. egyharmada/fele tartalmaz kovalensen kötött foszfátot, így érthető, hogy a módosítás végrehajtása számos enzim részvételét igényli és ennek megfelelően a humán genom kb. 500 protein kinázt kódol. Ezzel szemben a protein foszfatázok családjába csak mintegy 150 fehérje tartozik, közülük is 40-nél kevesebb a szerin/treonin specifikus enzimek száma. A tirozin kinázok és a tirozin foszfatázok mennyisége közel azonos, míg a Ser/Thr kinázok száma jóval meghaladja a Ser/Thr foszfatázokét (Shi, 2009; Butler és mtsai., 2013). A számbeli eltérés lehetővé teszi, hogy a Ser/Thr kinázok változatos szerkezettel és szelektív szubsztrátspecifitással rendelkezzenek. Ezzel szemben a szerin/treonin protein foszfatázok katalitikus alegységei nagymértékben hasonlóak, a szubsztrátspecifitásukat a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységek biztosítják (Cohen, 2002).



2. ábra A fehérje foszforiláció és defoszforiláció

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosítása és jellemzése

A foszfoprotein foszfatázokat három csoportba sorolhatjuk, aszerint, hogy mely aminosav oldalláncokat defoszforilálják. Így megkülönböztetjük a már említett foszfo-Ser/Thr- vagy foszfo-Tyr oldalláncokat defoszforiláló enzimeket, de léteznek kettős specifitású foszfatázok is, amelyek mindhárom foszfoaminosav oldalláncot képesek defoszforilálni (Barford, 1995; Hunter, 1995). Munkacsoportunk a szerin/treonin specifikus foszfatázokkal foglalkozik, amelyek biokémiai tulajdonságaik alapján feloszthatók foszfoprotein foszfatázok (PPP), fémion-függő protein foszfatázok (PPM) és aszpartát alapú foszfatázok (FCP) csoportokra (Butler és mtsai., 2013) (3. ábra).



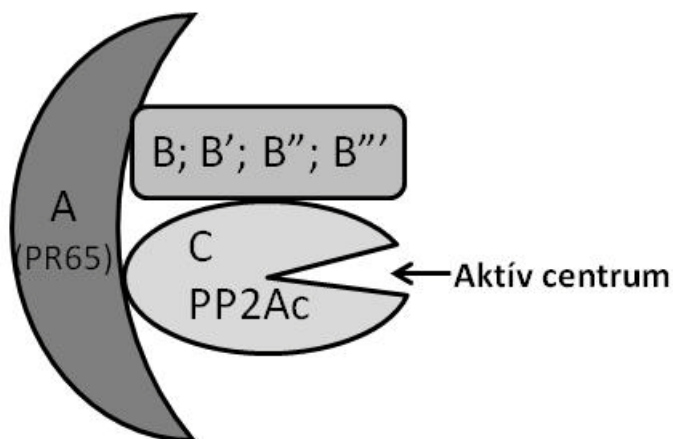
3. ábra A Ser/Thr családba tartozó foszfatázok csoportosítása (Shi, 2009)

A foszfoprotein foszfatáz alcsaládban 7 foszfatáz különíthető el: PP1, PP2A, PP2B (vagy kalcineurin), PP4, PP5, PP6 és PP7 (Cohen, 1997). Habár a kutatások a PP1, PP2A és PP2B szerkezetét, szabályozását és szerepét vizsgálják leginkább, az azonban csaknem minden PPP enzimről ismert, hogy holoenzimként működnek, és katalitikus és szabályozó alegységekből épülnek fel.

Kutatásaink során elsősorban a protein foszfatáz-1 (PP1) és a protein foszfatáz-2A (PP2A) enzimek vizsgálatával foglalkozunk, ezért a továbbiakban ezek jellemző sajátosságait ismertetem.

A PP2A szerkezete

Az eukarióta sejtekben a PP1 mellett a másik fő szerin/treonin protein foszfatáz, a PP2, amely a PP1-el ellentétben nem gátolható I-1 és I-2 fehérjékkel és heparinnal. A PP2 fehérjéknek három altípusa ismert: PP2A, amely az aktivitásához nem igényli fémion jelenlétét, PP2B (kalcineurin), amely Ca^{2+} -kaldmodulin függő, és PP2C, amely Mg^{2+} függő (Ingebritsen és Cohen 1983). A PP2A az élesztőtől egészen az emberig nagyfokú homológiát mutat, ami csakúgy, mint a PP1 esetében (ld. később) az enzim széles körű szerepére utal. A PP2A-nak fontos szerepe van a sejtosztódásban és sejthalálban, a sejtciklus szabályozásában, a citoszkeleton dinamikájában, számtalan jelátviteli útvonalban (Janssens és Goris 2001) és azonosították, mint tumor szupresszort is (Janssens és mtsai., 2005).



4. ábra PP2A szerkezeti felépítése

Ennek a sokrétű feladatnak az ellátását a katalitikus alegységhez kapcsolódó szabályozó alegységek biztosítják. A PP2A a 36 kDa-os katalitikus C alegységből (PP2Ac), a

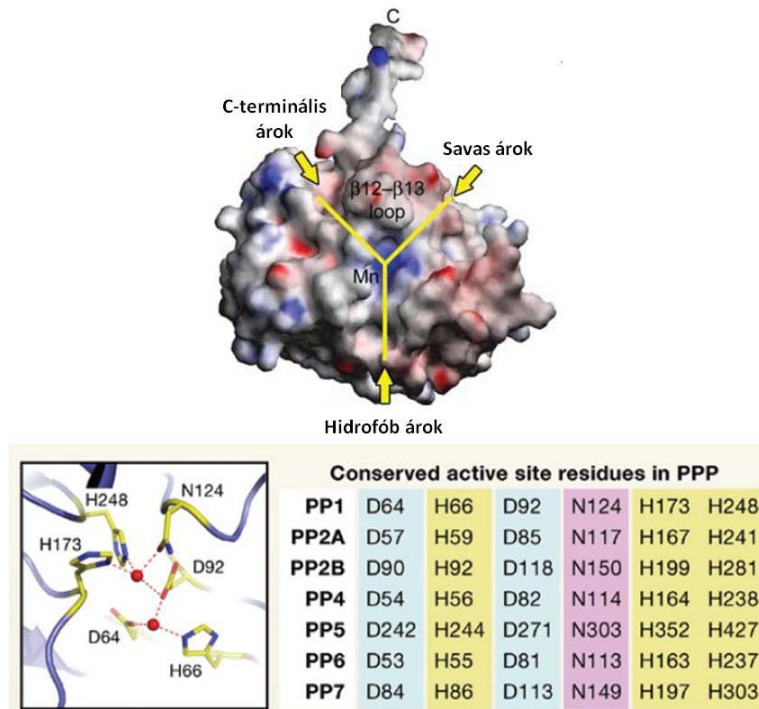
65 kDa-os A regulátor alegységből (PR65) áll. E két alegység együttesen az enzim alapvázat (core enzyme) alkotja, és ehhez kapcsolódhatnak még a B alegység különböző változatai, amely így a trimer PP2A holoenzimet hozza létre (4. ábra). A katalitikus alegységnek két izoformája, az α és β ismert. Annak ellenére, hogy a PPP családban a katalitikus alegységek nagyfokú homológiát mutatnak, a PP2Ac-től eltérő enzimek mégsem képesek dimert létrehozni az A regulátor alegységgel, mert a különböző katalitikus alegységek regulátor alegységek kötődéséért felelős szakasza variábilis. Az A regulátor alegység 15 helikális szerkezetű 39 aminosav méretű HEAT ismétlődésekből áll, és a katalitikus alegység a 11-15 HEAT szekvenciákhoz kötődik (Groves és mtsai., 1999; Xing és mtsai., 2007). A B alegységnek több formáját mutatták ki (B, B', B'', B'''), amelyek szekvenciája jelentősen eltér. Mindegyik alegységnek (A, B és C) legalább két izoformája létezik, amelyek sejt és szövet specifikusak, ezzel is növelve a PP2A szerkezeti és funkcionális diverzitásának lehetőségét (Shi, 2009).

A PP1 szerkezete

A PP1 az összes eukarióta sejtben megtalálható, ami jelentős szerepére utal az élővilágban. Számos, eltérő típusú folyamatban vesz részt, mint például sejtosztódás, apoptózis, fehérjeszintézis, metabolizmus, citoskeletális szerveződés és membrán receptorok működésének szabályozása (Ceulemans és mtsai., 2002).

Az emlősökben a 35-38 kDa méretű katalitikus alegység (PP1c) három PP1 gén terméke, amelyek öt izoformát kódolnak: PP1 α_1 és annak „splice” variánsa a PP1 α_2 , PP1 δ , PP1 γ_1 és az utóbbi „splice” variánsa a PP1 γ_2 (Dombrádi és mtsai., 1990; Sasaki és mtsai., 1990; Durfee és mtsai., 1993). A PP1 γ_2 izoformán kívül, ami a testiszben és az agyban található meg, az összes izoforma általánosan előfordul más szövetekben, de sejten belüli lokalizációjuk eltér. A PP1c kristályszerkezetét mikrocisztin inhibitorral (Goldberg és mtsai., 1995), foszfátanalóg volframáttal (WO₄²⁻) (Egloff és mtsai., 1995), a glikogén-kötő alegység rövid peptidszakaszával (Egloff és mtsai., 1997), okadánsavval (Maynes és mtsai., 2001), kalikulin-A-val (Kita és mtsai., 2002) és a MYPT1 szabályozó alegység N-terminális peptidjével (Terrak és mtsai., 2004) együtt kristályosítva határozták meg. A PP1c N-terminális doménjának Y-alakú árkában helyezkedik el az aktív centrum, amelyben két fémion, a Mn²⁺ és a Fe²⁺, található, és koordinációjában három hisztidin, két aszparaginsav és egy aszparagin vesz részt. Az aktív centrumok nagyfokú homológiát mutatnak az egyes PP1c

izoformákban (Shi, 2009). Az aktív centrumban található fémionok egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén elősegítik a szubsztrát foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét. Habár a PP1 katalitikus alegységek önmagukban is képesek a szubsztrátmolekulák defoszforilációjára, azonban egy vagy több regulátor alegység kötődésével és szabályozásával a kialakult holoenzim aktivitása módosítható.



5. ábra PP1c katalitikus alegység Y-árka (Terrak és mtsai., 2004) és a PP1 izoformák katalitikus alegységeinek az aktív centrum kialakításában részt vevő, konzervált aminosavak (Shi, 2009)

A katalitikus alegységnek regulátor alegységhez való kötődésével a szabályozási lehetőségek kiszélesednek. Tanulmányok kimutatták, hogy habár a regulátor alegységek szekvenciájukat tekintve jelentős mértékben eltérnek egymástól, azonban általában tartalmazzák a PP1c katalitikus alegység-kötő motívumot, K/R_{-x1}-V/I_{-x2}-F/W (Egloff és mtsai., 1997), amelyet általánosan RVxF motívumként adnak meg. Az RVxF motívum a PP1c katalitikus centrumától távoli hidrofób zsebhez kötődik (Egloff és mtsai., 1997). Ezt a kapcsolatot tovább erősítik a regulátor alegység bázikus oldalláncai és a PP1c savas oldalláncai között kialakult kötések. Biokémiai és molekuláris dinamikai módszereket felhasználva pontosabban meghatározták a PP1c-kötő motívum lehetséges szekvencia variánsait (Meiselbach és mtsai., 2006), ami újabb és újabb regulátor alegységek felfedezését eredményezte. Munkacsoportunk a miozin foszfatáz holoenzimet (MP) is tanulmányozza. A miozin foszfatázt először izomszövetekben jellemezték, és szerepét a kontraktilitás szabályozásában ismerték fel, amely

a miozin 20 kDa molekulatömegű könnyűlánc (MLC20) defoszforilációja által valósul meg. A MP egy PP1 katalitikus alegységből (P β) és a miozinhoz kötődő szabályozó alegységből (MYPT1) áll, emellett tartalmaz egy 20 kDa méretű, MYPT1-hez kötődő alegységet is (M20). A MP működését a MYPT1 célra irányító (myosin phosphatase targeting subunit) regulátor alegység szabályozza, hiszen kölcsönhatást létesít a PP1 katalitikus alegység és a szubsztrát között. A MYPT1 szabályozó alegység N-terminális szakaszán található a ³⁵KVFK³⁸ PP1c-kötő motívum. A MYPT1 úgy kapcsolódik a PP1c-hez, hogy az a katalitikus árok hidrofób szárának meghosszabbításával elősegíti a szubsztrát kötődését és ezzel a kialakult holoenzim katalitikus aktivitását növelni képes. A MYPT1 regulátor alegységen található gátló helyek (Thr696 és Thr853) kinázok (pl. Rho-kináz (ROK), integrinhez kapcsolódó kináz (ILK), leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK)) általi foszforilációja a MP aktivitásának gátlását eredményezi. Ez a gátló foszforiláció és a jelenleg még vitatott PP1c-MYPT1 komplex autodefoszforilációja szükséges a miozin alapfoszforilációjának és a citoszkeleton stabilitásának a fenntartásához (Khasnis és mtsai., 2014).

A Ser/Thr foszfatázok gátlása természetes toxinokkal és inhibitor fehérjékkel

Inhibitor toxinok és szabályozó szerepük

A PP1 katalitikus alegység Thr320 aminosav oldalláncának (Li és mtsai., 2007), illetve a PP2A Tyr307 aminosav oldalláncának (Chen és mtsai., 1994) foszforilálásával a két enzim aktivitása gátolható. A PP1 és PP2A enzimek gátlására a természetben előforduló, mikroorganizmusok által termelt membránpermeábilis toxinok, nevezetesen a mikrocisztin-LR (MC-LR), kantaridin, okadánsav (OA), kalikulin-A (CLA), tautomycin (TM) is alkalmasak. Használatuk nagy előnye, hogy koncentráció-függő módon képesek bizonyos mértékű szelektivitással gátolni a PP1 és PP2A enzimeket, és csak magas koncentrációban gátolják a PP2B protein foszfatázt. Alkalmazásukkal a sejtekben megnő a foszforilációs szint, ami az egyes foszfatázok szerepének meghatározásában elengedhetetlen (MacKintosh és MacKintosh, 1994; Erdődi és mtsai., 1995). A mikrocisztin-LR (IC₅₀ értékek: PP1 0,2 nM; PP2A 0,2 nM) egy olyan heptapeptid, amely gátolja a foszfo-szubsztrát hidrolízisét és kötődését azzal, hogy az aktív centrumban található fémionokkal lép kapcsolatba, és a

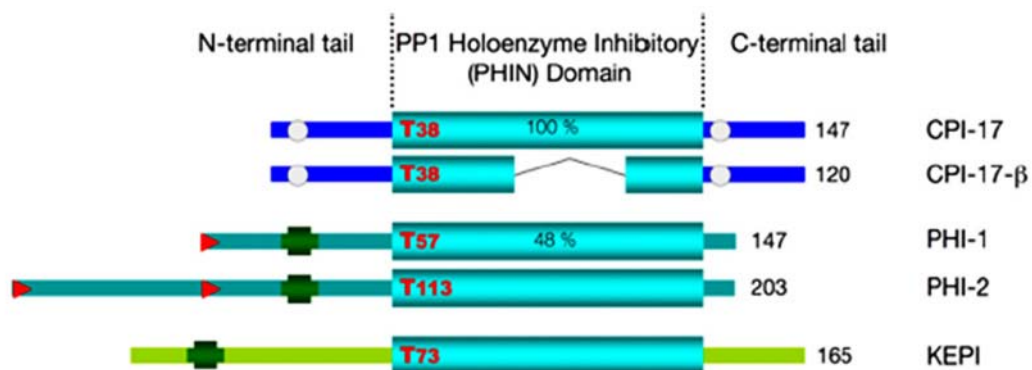
hidrofób árokba kötődve lefedi a katalitikus centrum szubsztrátkötő zsebének egy részét. Ez a gátlás irreverzibilis, mivel a MC-LR kovalens kötést létesít a PP1 katalitikus alegység Cys273 aminosav oldalláncával (Goldberg és mtsai., 1995). Az okadánsav (IC_{50} értékek: PP1 20 nM; PP2A 0,2 nM) is a hidrofób árokkal lép kölcsönhatásba és ott hidrogén-kötést hoz létre a Tyr272 aminosav oldallánccal és a katalitikus centrum bázikus oldalláncaival (Maynes és mtsai., 2001). Munkánk során kalikulín-A (CLA) (IC_{50} értékek: PP1 0,5-2 nM; PP2A 0,1-1 nM) és tautomycin (TM) (IC_{50} értékek: PP1 0,2 nM; PP2A 1-10 nM) toxinokat használtunk olyan koncentrációban, amelyben a CLA a PP2A (50 nM, (Yan és Mumby, 1999)), míg a TM a PP1 (1 μ M, (Favre és mtsai., 1997)) enzimeket szelektíven gátolta sejtes rendszerekben (ld. később az „Anyagok és módszerek” fejezetben). Ezek a toxinok lefedik a katalitikus centrum egy részét, így megakadályozzák a foszfo-szubsztrát kötődését és hidrolízisét.

Inhibitor fehérjék és szabályozó szerepük

A legtöbb inhibitor fehérje foszforiláció-függő, és gátló hatásukat a treonin oldalláncukon történő foszforiláció után fejtik ki. A fehérjék foszforillását különböző kinázok végezhetik. Az I-1 és a DARPP-32 PKA, míg a PHI, CPI-17 és KEPI PKC által foszforilálódik (Eto és Brautigan, 2012). A foszforilált treonin és a környezetében lévő aminosavak szubsztrátanalógnaként viselkedve a PP1c katalitikus alegység centrumának közelébe kötődve gátolják az enzim működését (Goldberg és mtsai., 1995). Az inhibitor fehérjék foszforiláció-függésének jelentőségét jelzi, hogy ha egy-egy folyamatban magas fehérje-foszforilációs állapotokra van szükség, akkor a megnövekedett kináz aktivitások révén az inhibitor fehérjék foszforilációja foszfatáz gátlást is eredményez.

A I-1 és I-2 volt az elsőként felfedezett PP1 inhibitor fehérje. Ezek azonban csak a szabad állapotban lévő PP1c katalitikus alegység gátlására képesek, míg ha a PP1c pl. a miozin foszfatáz holoenzim része, akkor az I-1 és I-2 fehérjék csak kismértékben gátolnak vagy hatástalanok. Egy 1993-ban megalkotott elmélet szerint, ha a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége (G_M) a PP1c kötő motívum Ser67 aminosav oldallánca foszforilálódik PKA által, akkor a PP1c disszociál a regulátor alegységről, így azt a foszfo-I-1 gátolhatja (Hubbard és Cohen, 1993). Ez a felvetés azonban nem magyarázta, hogy az újonnan felfedezett CPI-17, amely nem tartalmazza az RVxF PP1c-kötő motívumot, hogyan képes a miozin foszfatáz holoenzim (MP) gátlására. A CPI-17 a MP MYPT1 alegység felszabadítása helyett a MYPT1-hez és PP1c-hez is kötődik, így gátolva a MP-t (Eto, 2009). A CPI-17 családra (CPI-17, PHI-1, KEPI) közösen jellemző, hogy három doménből épülnek

fel: N-terminális domén, C-terminális domén és egy középső PHIN domén (Hayashi és mtsai., 2001). Míg a PHIN domén nagyfokú homológiát mutat, különösen az enzimaktivitásért felelős treonin aminosav környékén (CPI-17: A³⁵RVTVKYDRKE⁴⁵; KEPI: G⁷⁰KVTVKYDRKE⁸⁰), addig az N- és C-terminális domén igen variábilis az egyes családtagok között (Eto, 2009). A legnagyobb különbséget a PP1c kötő motívum megléte adja, hiszen a CPI-17 fehérjén kívül a többi enzim N-terminális szakaszán ez a szekvencia megtalálható (6. ábra), ezáltal foszforilálatlan formában is kötődik PP1c-hez.



6. ábra A CPI-17 család tagjai. A KEPI és PHI fehérjékben az N-terminális doménen megtalálható a PP1 kötő motívum (zöld négyzet) (Eto, 2009)

A foszforiláció függő KEPI inhibitor fehérje

A KEPI inhibitor fehérjéről igen keveset tudunk, annak ellenére, hogy PP1 gátló szerepe miatt jelentősen befolyásolhatja a sejtek foszforilációs állapotát. A KEPI-t 2002-ben végzett kísérletek során fedezték fel, miközben morfin által szabályozott gének után kutattak patkány agyban (Liu és mtsai., 2002), de szívben és izomban is expresszálódik. Ugyanez a munkacsoport egér agyi régióiban is meghatározta a KEPI fehérje jelenlétét, és feltételezésük szerint a KEPI-nek szerepe lehet a PP1 aktivitásának szabályozásán keresztül a különböző idegi folyamatokban és neurotranszmitterek felszabadulásának regulálásában (Gong és mtsai., 2005). A KEPI fehérjét azonban nem sikerül azonosítani az MCF-7 emlőtumor sejtvonalban, így ez a sejtvonal kiválóan alkalmas a fehérje által indukált változások tanulmányozására (Wenzel és mtsai., 2007). A KEPI a CPI-17 fehérjecsalád tagja, és nagyfokú hasonlóságot mutat a foszfatáz gátló szekvencia tekintetében. A PKC, mint a CPI-17-szerű fehérjék leggyakoribb foszforiláló kináza, a Thr73 aminosav foszforilálásával aktiválja a KEPI-t, és

így az gátolja a PP1 aktivitását. A különböző kinázok általi foszforiláció eltérő biokémiai folyamatokban való részvételt jelez, ezért a KEPI szerepének feltárása érdekében a kutatások arra irányultak, hogy a PKC-n kívül mely más kinázok képesek még a KEPI-t foszforilálni, elsősorban a gátló szekvencián. A ciklikus nukleotid-függő kinázok (PKA és PKG) nem aktiválták a KEPI-t a Thr73 aminosav foszforilálásán keresztül, habár a PKA a Ser157 oldalláncot képes foszforilálni. Az ILK kináz a PKC-hez hasonlóan szintén foszforilálta a KEPI-t a már említett gátló szekvencián. Az ILK-ről ismert, hogy a MP MYPT1 alegységének foszforilálásával szabályozza a holoenzim működését, azonban emellett a KEPI ILK általi aktivációjának is szerepe lehet a MP működésének szabályozásában (Erdődi és mtsai., 2003).

PP1 szerepe leukémiában

A daganatos elváltozások során általában, így leukémiás megbetegedések esetében is, elmondható, hogy a kinázok által katalizált foszforilációk és a foszfatázok által végrehajtott defoszforilációk kényes egyensúlya felborul, így a túlélésben és apoptózisban részt vevő kináz kaszkád útvonalak, mint pl. p42/44Erk1/2 (Dent és Grant, 2001) vagy Akt/PKB (Martelli és mtsai., 2011) aktiválódhatnak/gátlódhatnak. A kezeléseket során gyakran alkalmazott kemoterápiás szerek (pl. daunorubicin) hatásmechanizmusa azon alapul, hogy azok proapoptotikus fehérjék aktiválásával és túlélési faktorok gátlásával a daganatos sejtek apoptózisát indukálják (Wickremasinghe és Hoffbrand, 1999). Korábban felismerték, hogy leukémiás sejtekben alacsony a pRb expressziója, illetve hiperfoszforilált állapotban van, ami megnövelte a daganatos sejtek osztódását és a kemoterápiás szerekkel szembeni ellenállásukat (Kornblau és mtsai., 1998). Munkacsoportunknak (Kiss és mtsai., 2008) sikerült kimutatni leukémiás sejtekben, hogy a már említett membránpermeabilis toxin (CLA) önmagában csökkentette a sejtek túlélését, azonban ha kemoterápiás szerrel együtt alkalmazzuk, akkor a foszfatáz gátlás növeli a sejtek életképességét a kemoterápiás szerrel szemben (Chatfield és Eastman, 2004), azaz csökken a kemoszenzitivitás. Ez a felismerés, valamint az, hogy magas PP1 és PP2A aktivitást figyeltek meg leukémiás sejtekben (Yamamoto és mtsai., 1999), egyre inkább a foszfatázok szerepének feltárása felé fordítja az érdeklődést, mivel ezek az enzimek a terápia új célpontjaivá válhatnak. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a MP holoenzim befolyásolhatja a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációs állapotát leukémiás sejtekben (Kiss és mtsai., 2008), így felvetődött a kérdés, hogy a MP gátlására alkalmas

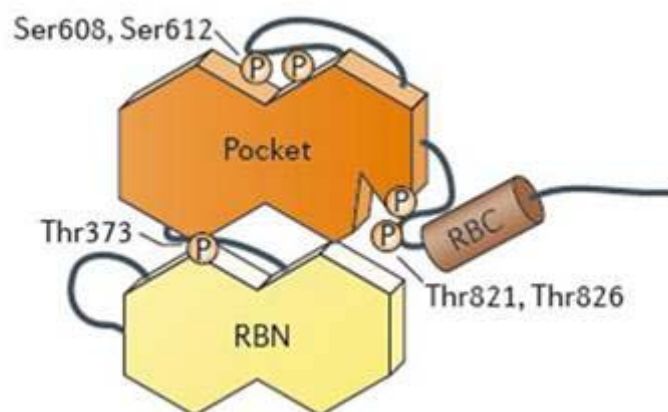
inhibitor fehérjéknek (CPI-17, KEPI) van-e szerepe a foszfo-pRb fehérje, és ezáltal a daganatos sejtek sejtciklusának/túlélésének szabályozásában.

A retinoblasztóma fehérje (pRb)

Osztódáskor a sejtek a G_0 -fázisból a megfelelő stimulus, például növekedési hormonok hatására a G_1 -fázisba lépnek, amit az S-, G_2 - és M-fázis követ. A ciklin-dependens kinázok és partnereik a ciklinek, adott fehérjék foszforilálásával szabályozzák a G_1/S és G_2/M átmenetet. E tekintetben az egyik legfontosabb fehérje a retinoblasztóma fehérje (pRb), aminek sejtciklus függő foszforilálása/defoszforilálása szerin és treonin oldalláncokon szükséges a sejtciklus és a sejt proliferáció végbemeneteléhez, de e folyamatnak szerepe lehet a túlélés/apoptózis egyensúlyának fenntartásában is.

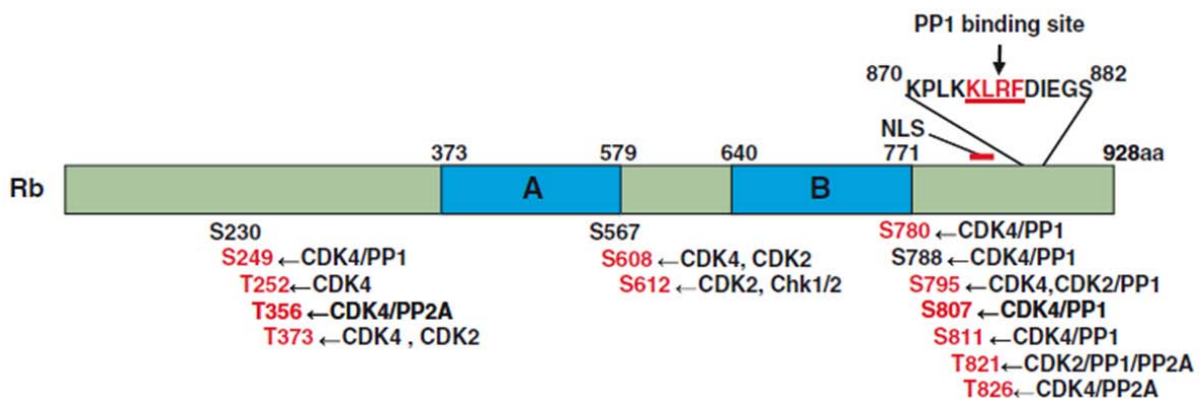
A pRb felfedezése során megfigyelték, hogy az adenovírus E1A onkoproteinjéhez kötődik, ami az E1A működését befolyásolta (Whyte és mtsai., 1988), illetve, hogy más, egymással nem rokon tumor vírusok (simian vírus 40 által kódolt T antigén, humán papillómavírus E7 fehérje) fehérjéivel is kapcsolódhat (DeCaprio és mtsai., 1988; Dyson és mtsai., 1989). Ezek alapján feltételezték, hogy a pRb fehérjének esszenciális szerepe van a fehérjék transzkripciójában. A retinoblasztóma tumorszupresszor gén termékeként expresszálandó 928 aminosavból felépülő pRb a sejtciklus szabályozás fontos eleme (Mittnacht, 2005). A pRb a transzkripciót szabályozó fehérjéktől egészen a kromatin átrendeződést reguláló enzimekig, több mint 30 celluláris fehérjével képes kapcsolatot létrehozni, de a legfőbb partnere, az E2F transzkripciós faktorhoz való kötődése révén fontos szerepe van az E2F által irányított transzkripció szabályozásában, a DNS replikációban és a sejtciklus regulálásában (Dyson, 1998). Az E2F család tagjai (E2F1-8), a transzkripció aktivátorok (E2F1, E2F2, E2F3a) és a transzkripció represszorok (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7, E2F8) csoportokba sorolhatóak. A pRb N-terminális régiója az 1-378 aminosav szakaszt foglalja magában, amit a kis-zseb (pocket) domén követ (379-772. aminosav). A kis-zseb egy S (spacer)-szakasszal elválasztott A- (394-571. aminosav) és B- (649-773. aminosav) doménra különül el, illetve tartalmazza azt a konzervált régiót, ami az LxCxE motívumot tartalmazó fehérjék kötéséhez szükséges. Ilyen fehérjék például a már említett humán papillómavírus E7 fehérjéje és D-típusú ciklinek (Durfee és mtsai., 1993). A nagy-zseb domént a C-zseb (773-870. aminosav) a kis-zseb szakasszal együtt alkotja, és ez felelős az E2F1 transzkripciós faktor kötéséért.

A pRb partnerekhez való kötődését foszforilációs állapota is befolyásolja. (Mittnacht, 2005). Korai G₁-szakaszban a pRb alulfoszforilált formában kötődik az E2F1 faktorhoz, ami a sejtciklus leállítását eredményezi, mivel gátlódik a DNS szintézishez szükséges E2F-függő gének átírása. Növekedést stimuláló szignálok hatására a pRb CDK-függő hiperfoszforilációja következtében elveszti az E2F1 faktor-kötő képességét, így a felszabaduló E2F1 beindítja azoknak a fehérjéknek a szintézisét, amelyek az S-fázisba való átmenethez szükségesek (Chellappan és mtsai., 1991). A foszforilációt kezdetben (G₁ szakasz) a ciklin D/CDK4 komplex, majd a G₁/S fázisban a ciklin E/CDK2, és az S fázisban a ciklin A/CDK2 komplexek végzik. A pRb a teljes foszforiláltságát a G₂/M fázis során éri el. A pRb foszforilálásának szabályozásában a ciklin/CDK komplexet gátló inhibitorok (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) (Besson és mtsai., 2008) és CDK4 inhibitorok (Canepa és mtsai., 2007) vesznek részt. Eddig több mint tíz aminosav oldalláncot azonosítottak, aminek a foszforilációja eltérő módon befolyásolja a fehérjékkel való kölcsönhatását. Egyes aminosavak foszforilációjának kitüntetett szerepe van az E2F1 transzkripciós faktor felszabadításában, illetve kötődésének gátlásában. A Thr373 oldallánc foszforilációja az N-terminális domén és a kis-zseb domén interakciót, míg a Ser608, Ser612 aminosavak foszforilációja az E2F-transzaktivációs domént kötő régióhoz való kapcsolódást eredményezi, a Thr821 és Thr826 aminosavak foszforilációja pedig az LxCxE domént tartalmazó fehérjék kötődését akadályozza meg (Dick és Rubin, 2013) (7. ábra). Kimutatták, hogy a ciklin A/CDK2 és a PP1c kötő motívumok átfedésben vannak egymással a C-terminális szakaszon, így a pRb aktivitásának szabályozásában a két enzim versenyzik egymással. Ezt a fajta kompetíciót nem figyelték meg a retinoblasztóma családba tartozó másik két fehérjénél (p107 és p130) (Hirschi és mtsai., 2010).



7. ábra E2F és LxCxE motívumot tartalmazó fehérjék kötődésének feltétele (Dick és Rubin, 2013)

Defoszforilációval a pRb újra képes az E2F1 faktor kötésére, így gátolja annak működését. A defoszforilációt PP1 és PP2A enzimek egyaránt katalizálhatják (Ludlow és mtsai., 1993). A PP2A a ciklin-függő kinázok aktivitásának csökkentése révén közvetett módon járul hozzá a defoszforilációhoz (Yan és Mumby, 1999). Az is ismert, hogy több pRb oldallánc defoszforilációjában valamennyi PP1c izoforma részt vehet, de a PP1c a legfontosabb (Liu és mtsai., 2006) (8. ábra). A PP1c izoformák azonban feltehetően holoenzimként szabályoznak, mint pl. a miozin foszfatáz holoenzim (MP), ami a munkacsoportunk eredményei szerint defoszforilálja a Thr826 oldalláncot (Kiss és mtsai., 2008). A PP1c illetve a PP1c-t tartalmazó holoenzimek aktivitásának szabályozása akár inhibitor toxinokon, akár inhibitor fehérjéken keresztül lényegesen befolyásolja a pRb aktivitását, és ezáltal a sejtciklus szabályozását, így célunk volt a KEPI inhibitor fehérje lehetséges pRb reguláló szerepének feltárása.

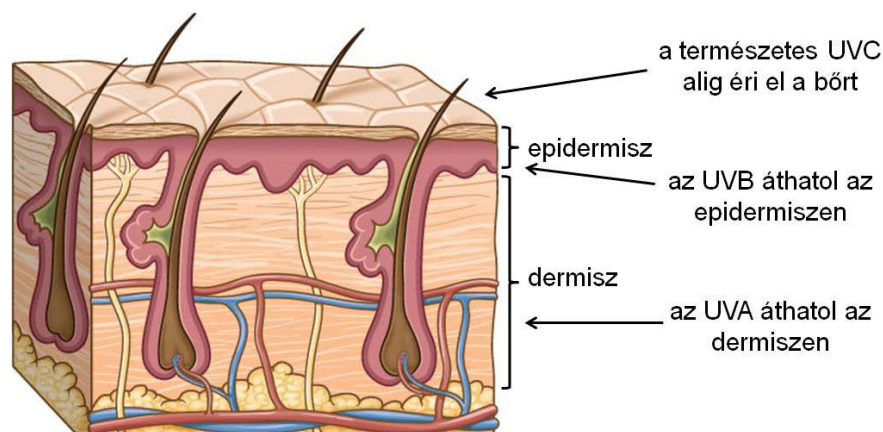


8. ábra A retinoblasztóma fehérje szerkezete és foszforilációs helyei (Kolupaeva és Janssens, 2013)

Az ultraibolya sugárzás

Az infravörös sugarak felfedezése 1800-ban, William Herschel nevéhez fűződik. Elmélete szerint a különböző színek eltérő hőt szállítanak a Napból. Ennek bizonyítására egy elsötétített szobában kivetített egy prizma által felbontott fénysugarat, és megmérte az egyes színtartományokban a hőmérsékletet. A hőmérséklet a lilától a vörös színig emelkedett, sőt a legmagasabb hőmérséklet a vörös alatti sötét területen volt. Ezt a tartományt elnevezte infravörös tartománynak. 1801-ben ezt az elméletet tovább gondolva, az elektrokémiával foglalkozó Johann Wilhelm Ritter a napfény sötétítő hatását tanulmányozta, azaz ezüst-kloriddal átitatott papírokat milyen hamar sötétíti be a napfény. Felfedezése szerint az ibolya szín felé haladva egyre hamarabb feketedtek be a papírcsíkok, sőt leghamarabb az ibolya

fölötti papír színeződött el. Ezt kezdetben „kémiai sugárzásnak” nevezték el, amit ma ultraibolya sugárzás néven ismerünk. Az ultraibolya sugárzás tovább bontható UVA, UVB és UVC tartományra. A látható fényhez legközelebb a 320-400 nm hullámhosszú UVA sugárzás esik. Ezt követi a 280-320 nm-es UVB sugárzás, és legvégül a 200-280 nm-es UVC tartomány. Az eltérő hullámhossz eltérő energiával párosul. A legnagyobb energiája a legalacsonyabb hullámhosszú UVC sugárzásnak van, majd az UVB sugárzásnak és a legalacsonyabb energiával az UVA rendelkezik. A legnagyobb károsodást az UVC sugárzás okozná, de a Föld légköre szinte teljesen kiszűri ezt a fényt, így a felszín csak minimális sugárzás éri. Habár az UVB sugárzást szintén jelentős mértékben elnyelné a Föld légköre és az ózon réteg, azonban az ózonréteg vékonyodásával ez a sugárzás egyre erősebbé válik. Azok az UVA sugárzásnál 1000-10,000-szer karcinogénebb UVB sugarak, amelyek mégis eléri a felszín, áthatolnak a bőr epidermisz rétegén (9 ábra). A D-vitamin képzése mellett magas energiájuk miatt jelentős a DNS károsító hatásuk, daganatok és más betegségek kialakulásáért tehető felelőssé. Az UVA sugárzás okozza a bőr barnulását, azaz pigment tartalmának sötétedését, de gyulladást (erythema) és bőrpírt is eredményez. A minimális gyulladást kiváltó dózis (minimal erythema dose) $36,4 \text{ J/cm}^2$ sugárzásnak felel meg (Lavker és mtsai., 1995). Az UVA a DNS károsító hatását indirekt módon, a reaktív oxigén gyökök (ROS) létrehozásával eredményezi (Rosenstein és Mitchell, 1987).



9. ábra UV sugarak penetráló képessége

Az epidermisz felépítése

A testünket fedő bőr három fő rétegből áll, a főként zsírból álló bőr alatti kötőszövetből (hipodermisz), a főként kollagénből és elasztinból álló irharétegből (dermisz) és a

keratinocitákból felépülő hámrétegből (epidermisz). A hámréteg tovább tagolható alaprétegre (*stratum basale*), sokszögletű sejtek rétegére (*stratum polygonale* vagy *stratum spinosum*), szemcsés rétegre (*stratum granulosum*), fénylő rétegre (*stratum lucidum*) és szarurétegre (*stratum corneum*). Az epidermiszben főleg a keratin-termelő keratinocita sejtek (hámsejtek) találhatóak, de a melanint termelő melanocita sejtek (festéksejtek), az immun-védelemben szerepet játszó, a monocita-makrofág rendszerhez tartozó, Langerhans sejtek és az idegi eredetű, lassan adaptálódó proprioreceptorok, a Merkel sejtek is jelen vannak. Így az epidermisz feladatai közé tartozik a mechanikai hatásokkal szembeni védelem, az egymással szorosan kapcsolódó sejtek által létrehozott fizikai barrier és vízzáró réteg kialakítása, valamint az UV védelem.

A keratinociták jellemzése

Az ektodermális eredetű keratinocita sejtek a hám sejtjeinek 90 %-át alkotják, az epidermisz bazális rétegében képződnek epidermális őssejtekből (Bickenbach, 2005), és a szaruréteggig vándorolnak. A keratinociták előtt két lehetséges szerep és útvonal áll: aktiválódnak vagy differenciálódnak. Az aktivációt növekedési faktorok, citokinek (pl. interleukin-1, tumor nekrozis faktor) váltják ki. Az aktivált keratinociták felgyorsult osztódó, migráló, citoszkeleton szerkezetét átformáló és a bazális membrán elemeit termelő képességgel jellemezhetők. Emellett termelnek még „parakrin szignálokat”, amelyek a környező endotél sejteket, melanocitákat, limfocitákat és a szomszédos keratinocitákat stimulálják a sérülések utáni hámosodás elősegítésében. (Freedberg és mtsai., 2001). A kb. 28 napig tartó vándorlásuk során differenciálódnak, elszarusodnak, keratin filamentumokat termelnek (keratinizáció) a *stratum spinosum* rétegtől kezdődően, és legvégül apoptotizálnak (Candi és mtsai., 2005). Ezzel egy barriert alakítanak ki, ami megakadályozza a vízvesztést, védelmet nyújt a fertőzésekkel szemben, véd a hővesztés és UV sugárzások káros hatásai ellen is. A keratinociták barrier funkcióinak fenntartásához kényes egyensúlyra van szükség a sejtek proliferációja, differenciációja és apoptózisa között (Eckert és mtsai., 1997; Gandarillas, 2000). Differenciációjuk során keratin fehérjét (KRT) termelnek, ami az összfehérje 80 %-át teheti ki. A keratin fehérjék igen ellenálló molekulák, hiszen nem hasítják őket sem a pepszin sem a tripszin proteázok, illetve oldhatatlanok vízben, de intermedier filamentumot képeznek (Steinert és mtsai., 1982), így létrehozzák a szervezet első védelmi vonalát. Kutatások során gyakran használnak HaCaT keratinocita sejteket, amelyek számos

mutációt hordoznak, pl. a p53 tumorszupresszor gén pontmutációja miatt szinte korlátlan ideig fenntarthatóak, és a KRT1 és KRT10 fehérjéket expresszálják.

Melanóma kialakulása és foszfofehérjék szerepe

A melanómás megbetegedésekre utaló fehérjék és fehérjepárok jellemző kifejeződése előtt a bőr daganatos megbetegedéseinek kialakulása történhet familiáris, nem UV-indukált és UV-indukált folyamatok által (Tímár és mtsai., 2013). Az UV sugárzásnak, származzon az akár a napsugárzásból, akár mesterséges forrásokból, rövid és hosszú távú hatásai is lehetnek. A nagyobb energiájú UVB sugárzásnak kitett bőrön néhány óra múlva jelentkezhet bőrpír, gyulladás, felhólyagosodás. UVA által pedig úgynevezett azonnali (direkt) pigmentáció (immediate pigment darkening) (Honigsmann és mtsai., 1986) jön létre a bőrön. Azonban az UVA sugárzásnak kitett keratinocita sejtekben a reaktív oxigén gyökök (ROS) felelősek a károsodások nagy hányadáért (Svobodova és mtsai., 2003). Az UV (UVA és UVB) sugárzás a sejtmagba behatolva DNS sérülést is okozhat (Tadokoro és mtsai., 2003). A DNS kettős szálain keletkező ciklobután pirimidin dimerek (CPD) és a (6-4)-fototermekek (64PP) hosszú távú károsodások kialakulásához is vezethetnek (Muramatsu és mtsai., 1992). A hosszú távú hatások közé tartozik még a photoaging (Yaar és Gilchrest, 1998) és a melanogenezis, azaz a melanómás megbetegedések (Gilchrest és mtsai., 1999). A melanociták melanoszómái által termelt melanin kezdetben védelmet biztosít, illetve képes csökkenteni az UV sugárzás káros hatásait, sőt, további melanin képződése indul meg. A keratinocita sejtekben aktiválódik a p53, ami proopiomelanokortin (POMC), a melanocita stimuláló hormon (MSH) vagy az adrenokortikotróp hormon (ACTH) prekuzora (Cui és mtsai., 2007). A 7-transzmembrán régióval rendelkező, kis G-fehérjével kapcsolt melanokortin-1 receptoron (MC1R) keresztül az MSH aktiválja a cAMP/protein kináz A (PKA)/CREB jelátviteli útvonalat és növeli a melanocitákban homodimert alkotó microphthalmia-asszociált transzkripciós faktor (MITF) mennyiségét, ami részt vesz a pigment szintézisben, ezáltal a pigmentációban, valamint szabályozza a melanin szintézisben részt vevő gének expresszióját. A MC1R receptor mutációja, illetve csökkent kifejeződése melanómás megbetegedésekben figyelhető meg (Gaggioli és mtsai., 2013). A melanin szint és a melanociták számának növekedése mellett az UV indukált védekezésben a keratinociták által termelt más molekulák is szerephez jutnak, mint pl. az endotelin, granulocita-makrofág stimuláló faktor (GM-CSF), leukémia gátló faktor (LIF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF) és a hepatocita növekedési faktor (HGF) (Hirobe

és mtsai., 2005). Ezek a molekulák a receptoraikhoz kötődve aktiválják a MAPK/ERK és PI3K/AKT útvonalakat (Heck és mtsai., 2004; Cao és Wan, 2009), és az apoptózis kivédésében, illetve a túlélés elősegítésében van szerepük. A túlzott UVB sugárzás által létrejött és felhalmozódott fototermékek és az UVA sugárzás gerjesztette ROS által okozott hatások azonban nem minden esetben védhetőek ki. Ezek a hatások fenntartott aktivációjú onkogéneket, alulműködő vagy hiányzó tumor szupresszor/DNS hibajavító géneket eredményeznek. A bőr daganatos megbetegedéseiben fontos szerephez jutnak a CDKN2A és CDKN2B génekről átíródó fehérjék, a p16^{INK4A} és a p15^{INK4b}, amelyek ciklin dependens kinázok (CDK4 és CDK6) gátlását okozzák. Alternatív „splicinggal” a CDKN2A génről egy másik fehérje, a p14^{ARF} is átíródik. A p16^{INK4A} és a p15^{INK4b} fehérjék a DNS-ben felhalmozódó hibák miatt, illetve annak kijavítása érdekében leállítják a sejtciklust a G1 fázisban. A p14^{ARF} viszont nemcsak a G1, de a G2/M fázis leállítását is végzi a p53 tumor szupresszor MDM2 általi gátlásán keresztül (Sharpless és DePinho, 1999; Williams és mtsai., 1999). Ezekben a fehérjékben vagy az ezeket kódoló génekből kialakuló mutációk a CDK4 és CDK6 állandó, fenntartott aktivációját eredményezik, és így a retinoblasztóma fehérje hiperfoszforilációjához vezet. Az UVA sugárzás során képződő ROS aktiválja a ciklin D expresszióját, ami szintén a pRb megnövekedett foszforilációját okozza, megszűnik az E2F gátlása, és ez a sejtek korlátlan és szabályozhatatlan osztódásához vezet. Emellett a ROS termékek inaktiválják a PP1 és PP2A enzimeket a cisztein aminosav oldalláncok és a katalitikus centrumokban megtalálható fémionok oxidációjával (Kim és mtsai., 2003). Mint ahogy azt már „A retinoblasztóma fehérje (pRb)” fejezetben említettem, a pRb aktivitásának szabályozásában a PP1 fehérjék is részt vesznek, így szabályozzák a sejtciklust, a sejtek osztódását, apoptózisát, ezért felmerült a kérdés, hogy a bőr UVA sugárzás által indukált daganatos megbetegedéseiben milyen szerepet tölthet be a PP1.

Melanóma marker fehérjék jellemzése

A KRT1/10 fehérjepár, az S100A8 kalcium-kötő fehérje megnövekedett expressziója, és a hiszton 1b fehérje csökkent mennyisége gyakran megfigyelhető a bőr daganatos megbetegedéseiben, és ezeket együttesen a bőr tumor marker fehérjéinek is nevezik (Brown és mtsai., 1996; Salama és mtsai., 2008; Karantza, 2011). A sejtek alakját meghatározó, a citoszkeletont létrehozó filamentumok 3 csoportba sorolhatóak. Átmérőjük, fizikai és kémiai tulajdonságaik alapján mikrofilamentumokra, mikrotubulusokra és a sejtek citoplazmájában

kötegeket képző intermedier filamentumokra oszthatóak. Az intermedier filamentumokra jellemző a sejt- és szövetspecifikus kifejeződés. Általánosságban elmondható, hogy az intermedier filamentumok a sejtmagi laminához tapadva „rögzítik” a sejtmagot, míg a sejthártya belső felszínén a dezmoszómákhoz és hemidezmoszómákhoz kapcsolódnak. A keratinok az epiteliális sejtekben találhatóak meg, és 54 gén expresszálja, amelyek két nagy csoportra, az I típusú (savas kémhatású) keratinokra (n=28) és a II típusú (bázikus vagy semleges kémhatású) keratinokra (n=26) oszthatóak fel. Érdeklődésünk középpontjában az I. típusba tartozó keratin 10 (KRT10) és a II. típusba tartozó keratin 1 (KRT1) áll.

Keratin 1/10: a kb. 65 kDa méretű KRT1 az epidermisz szuprabazális sejteiben termelődik. A KRT10 egy 56,5 kDa méretű molekula, ami posztmitotikus elszarusodó sejtekben fejeződik ki (Coulombe és Omary, 2002). A KRT10 expressziója csökken, ha sérül az epidermisz, és jelenléte gátolja a további sejtosztódást (Koch és Roop, 2004). A KRT1 és KRT10 heterodimert alkotva hozzák létre az intermedier filamentumot.

S100A8: az EF-kéz típusú, kalcium-kötő fehérjék közé tartozó S100 fehérjecsalád tagjai kalcium kötést követően konformáció változáson mennek keresztül, a célfehérjékhez kötődnek és extracelluláris és intracelluláris folyamatok szabályozásában vesznek részt. Az intracelluláris folyamatok közé tartozik a kalcium homeosztázis fenntartása, a sejtciklus, migráció, foszforiláció és citoskeletális elemek szabályozása. Extracelluláris molekulaként a citokinekhez hasonlóan működnek, és a glikozilált végtermékek receptorához (receptor for advanced glycation end products, RAGE), valamint a Toll-szerű receptorokhoz (TLR) kötődnek. Az S100 fehérjék és a daganatos megbetegedések közti kapcsolatot több tényező is alátámasztja: az S100 fehérjék az eltérő daganatokban eltérő mértékben expresszálódnak, daganat-specifikusak; olyan fehérjékhez kapcsolódnak és szabályozzák azokat, amelyek a daganatok kialakulásában jelentős szereppel bírnak (pl. NF- κ B, p53) (Chen és mtsai., 2014). Az S100 családba tartozó S100A8 fehérje a normál bőrben kevésbé expresszálódik, de sebgyógyulás folyamata során megnövekedik az expressziója (Thorey és mtsai., 2001).

Hisztón 1b (H1b): a hisztonok olyan nukleáris fehérjék, amelyek a nukleoszómák kialakításában vesznek részt. A nukleoszómákban a H2A, H2B, H3 és H4 2-2 példánya alakítja ki a hisztonmagot, amelyek összekötésében a H1-nek van szerepe. A H1 lizinben gazdag fehérje, ami egy rövid N-terminális szakaszból, egy középső globuláris részből és egy töltésben gazdag C-terminális szakaszból áll. A H1 a nukleoszómák azon részéhez kötődik, ahol a DNS be- és kilép. A H1-ről ismert, hogy a transzkripció nem-specifikus represszora is lehet (Zlatanova és Van Holde, 1992), így fokozódó- vagy csökkenő regulációja más fehérjék expressziójára is hatással lehet, illetve befolyásolhatja a sejtek osztódását/apoptózisát.

CÉLKITŰZÉSEK

Számos vizsgálat irányul arra, hogy a fehérjék foszforilációjának mértéke hogyan befolyásolja a különböző szervezetben és sejtekben kialakuló patológiás folyamatokat, illetve a sejtek túlélése és apoptózisa közti egyensúlyt. Ennek ellenére ez a kérdés még nem minden részletében tisztázott, különösen a tekintetben, hogy a protein foszfatázok milyen szerepet játszanak a fehérjék defoszforilálásában és ezzel a foszforiláció mértékének kialakításában. A PP1 és PP2A enzimek számos fehérjét szabályoznak, amelyeknek szerepe van a sejtek túlélésében, azonban ellentmondás is megfigyelhető, hiszen a protein foszfatázok gátlása túlélés elősegítése mellett eredményezhet sejthalált is. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a PP1 típusú miozin foszfatáz holoenzim befolyásolja a túlélést elősegítő retinoblasztóma fehérje (pRb) defoszforilációját (Kiss és mtsai., 2008), így a PP1 gátlása hatással van sejtciklusra és a sejthalálra is. A PP1 enzim gátlása membránpermeábilis toxinok mellett inhibitor fehérjéken keresztül is történhet. Munkánk során PP1 és PP2A specifikus toxinok alkalmazásával terveztük elkülöníteni e két enzim szerepét a sejtfolyamatokban, valamint tanulmányozni kívántuk eddig kevésbé vizsgált endogén PP1 inhibitorok szerepét a pRb defoszforilációjában. Az is ismert, hogy az UV sugárzás által létrejött DNS károsodás szabályozásában (Kuntziger és mtsai., 2011) és a keratinocitákat érintő patológiás folyamatokban is szerepe van a protein foszfatázoknak, és e tekintetben a PP1 szerepe még nem minden részletében tisztázott.

Ezek alapján a munkám fő célkitűzései az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

1. Membránpermeábilis foszfatáz inhibitor toxinok hatásának tanulmányozása kemoterápiás szerek sejthalált indukáló folyamataira leukémiás sejtekben: a PP1 és PP2A kemozenzitivitást szabályozó szerepének vizsgálata.
2. A KEPI foszfatáz inhibitor fehérje expressziója és hatásának tanulmányozása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára.
3. A PP1 szerepének vizsgálata UVA által kiváltott patológiás folyamatokban HaCaT keratinocita sejtekben és egér bőrben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

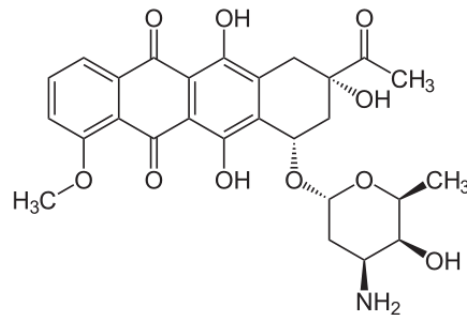
A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásból: nitrocellulóz membrán (0,45 μm pórusméret) (GE Healthcare); BCA fehérje meghatározó kit, nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagens (Pierce); DMEM tápoldat (Dubelcco's Modified Eagle's Medium); MEM tápoldat (Minimum Essential Medium); RPMI 1640 tápoldat; EpiLife tápoldat; L-glutamin oldat; tripszin, borjúsérum (FBS); DNR (daunorubicin); proteáz inhibitor koktél tabletták, (Roche); kalikulin-A (CLA); panPP1c siRNS (Santa Cruz); Gene Juice transzfekciós reagens; tautomycin (TM); kaszpáz-3 immunoassay/aktivitás kit (Merck Millipore); forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) (Biokasztel); FLAG-KEPI plazmid (GenCopoeia); Texas Red Phalloidin (Molecular Probes); dual color fehérje molekulatömeg standard (Bio-Rad); DharmaFect 2 transzfekciós reagens (Thermo Scientific). Az egyéb felhasznált vegyszerek a kereskedelemben elérhető legnagyobb tisztaságú készítmények voltak.

Antitestek

Kísérleteink során a fehérjék és foszfofehérjék detektálására használt antitesteket a feltüntetett irodalmi hivatkozásban leírtak szerint alkalmaztuk, illetve kereskedelmi forgalomból szereztük be, amit a gyártók utasításai szerint használtuk: anti-CPI-17^{pT38} (Santa Cruz), anti-pRb^{pT826} (Sigma-Aldrich), anti-ERK1/2^{pT202/Y204} (Cell Signaling Technology Inc.), anti-Akt^{pS473} (Cell Signaling Technology Inc.), anti-MYPT^{pT695} (Upstate), anti-MYPT^{pT850} (Upstate), anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (Lontay és mtsai., 2004), anti-FLAG-tag (Sigma-Aldrich), anti-KEPI (Abcam), anti-PP1 α/γ (E9) (Santa Cruz Biotechnology), anti-PP1 δ (Upstate) anti-aktin (Sigma-Aldrich), anti- α -tubulin (Upstate), anti-PARP (Cell Signaling Technology Inc.), anti-hasított-PARP (Cell Signaling Technology Inc.), anti-keratin1 (KRT1) (Systems Biology), anti-keratin10 (KRT10) (Systems Biology), anti-S100A8 (Sigma Life Science), anti-Histone H1 (AE-4) (Santa Cruz Biotechnology); HRP-konjugált anti-nyúl IgG, HRP-konjugált anti-egér IgG (Sigma-Aldrich); Alexa 488 anti-nyúl IgG (Molecular Probes).

Kemoterápiás szer (daunorubicin) és toxinok (kalikulin-A, okadánsav, tautomycin) szerkezete és hatásmechanizmusuk

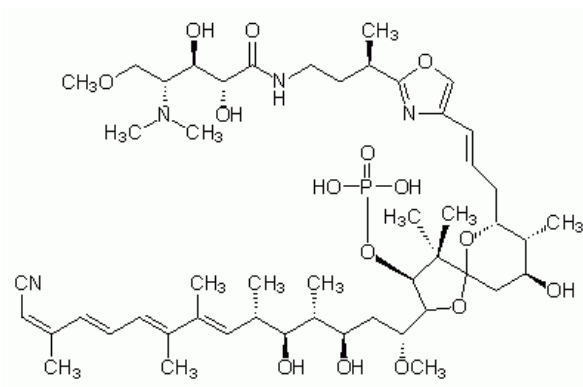
Daunorubicin:



10. ábra A daunorubicin szerkezete

A C₂₇H₂₉NO₁₀ összegképletű daunorubicin (daunomycin) egy olyan antraciklin alapú antitumor ágens, amelyet a *Streptomyces peucetius* gombából nyernek ki (Di Marco és mtsai., 1981), és az akut mieloid leukémia gyógyításában használják. A tetraciklikus gyűrűhöz daurózamin kapcsolódik, amit a citokróm P₄₅₀ reduktáz szemikinin formává alakít át, és ez oxigénből folyamatos aktív gyökök felszabadulását eredményezi. Ez szerepet játszhat a hatásában, de ez a folyamat leginkább kardiotoxicitásért felelős, valamint DNS- és membránkárosodást is okozhat. A fő apoptotikus hatása azon alapul, hogy a topoizoméráz II gátlásán keresztül leállítja a DNS replikációját oly módon, hogy stabilizálja a topoizoméráz II komplexet miután az elhasította a DNS kettős szálát. Képes a DNS-be interkalálódni, ezzel megváltoztatni a DNS integritását, ami a DNS funkciók károsodását okozhatja.

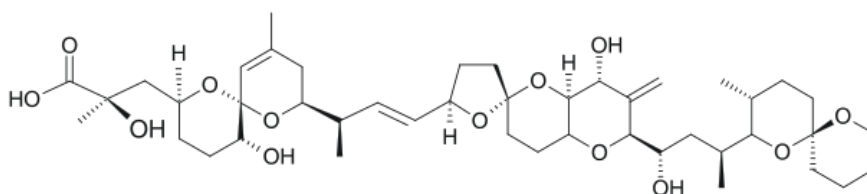
Kalikulin-A:



11. ábra A kalikulin-A szerkezete

A szerin/treonin foszfatáz inhibitorok közé tartozó, $C_{50}H_{81}N_4O_{15}P$ összegképletű membránpermeábilis kalikulin-A-t a *Discodermia calyx* tengeri szivacsból nyerték ki, ami antitumor hatása mellett erős toxicitást mutatott egereken (Kato és mtsai., 1988). A kalikulin-A a foszfátcsoportjával kapcsolódik a fémion-kötőhelyhez, valamint szoros kölcsönhatást hoz létre a hidrofób és savas árokkal (Kita és mtsai., 2002). A kalikulin-A gátlására jellemző IC_{50} értékek: PP1 0,5-2 nM; PP2A 0,1-1 nM. Az általunk alkalmazott koncentrációban (50 nM) a kalikulin-A korábbi eredmények szerint (Yan és Mumby, 1999) a PP2A szelektív gátlószere sejtes rendszerekben. A kalikulin-A nincs hatással a savas vagy alkalikus foszfatázokra, illetve a foszfortirozin foszfatázokra.

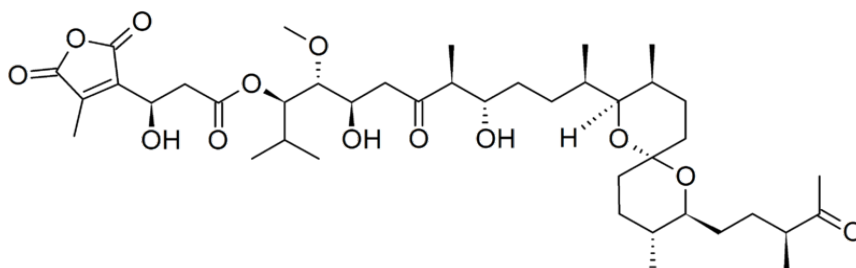
Okadánsav:



12. ábra Az okadánsav szerkezete

A $C_{44}H_{68}O_{13}$ összegképletű membránpermeábilis okadánsavat a *Halichondria okadae* tengeri szivacsból izolálták először (Tachibana. és mtsai., 1981). Az okadánsav egy reverzibilis és szelektív gátlószere a szerin/treonin specifikus protein foszfatázoknak, a gátlásra jellemző IC_{50} értékek: PP2A 0.2 nM; PP1 20 nM.

Tautomycin:



13. ábra A tautomycin szerkezete

A $C_{41}H_{66}O_{13}$ összegképletű membránpermeábilis tautomycint a *Streptomyces spiroverticillatus* baktériumból izolálták először (Cheng és mtsai., 1987), de antifugális hatása mellett daganatellenes szerként is ismeretes. A PP1 és PP2A gátlására is alkalmas toxin azonban sejteken alkalmazva a PP1 aktivitását hatékonyabban gátolja. A tautomycin gátlására

jellemző IC₅₀ értékek: PP1 0,2 nM; PP2A 1-10 nM. Az általunk alkalmazott koncentrációban (1 µM) a PP1 szelektív gátlószerének tekinthető sejtes rendszerekben (Favre és mtsai., 1997).

Sejttenyésztés

A kísérletekben használt sejtvonalak az ECACC-tól (European Collection of Cell Cultures) származnak, míg az NHEK, normál humán epidermális keratinocita sejteket Dr. Bíró Tamás (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet) bocsájtotta rendelkezésünkre. A sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5 % CO₂ és 95 % levegő vízgőzzel telített keverékében történt. A THP-1 humán akut leukémia monocita és a KG-1 myeloid leukémiás sejteket RPMI 1640 oldatban, az MCF-7 humán emlő adenocarcinoma és a HeLa méhnyak carcinóma sejteket MEM oldatban, míg a tsa201 humán embrionális vese sejteket és HaCaT keratinocita sejteket DMEM oldatban tartottuk, amelyek 10 % FBS-t és 2 mM L-glutamint tartalmaztak. Az MCF-7 sejtvonalhoz használt MEM oldat ezen kívül tartalmazott még 0,1 mM nem esszenciális aminosav oldatot is. Az NHEK sejteket EpiLife médiumban tenyésztettük, amely Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) oldatot, 100 µg/ml streptomocint, 100 IU/ml penicilint és 50 ng/ml amphotericin B-t tartalmazott, valamint a sejteket 1 % kollagénnel bevont tenyésztő edényekben növesztettük.

Sejtek kezelése és lízise

THP-1 és KG-1 sejtek

A kísérletek során a sejteket (~5x10⁶/ml) szérummentes médiumban éhezettük 16 órán át, majd 50 nM CLA-val (1 óra), 1µM TM -el (1 óra) vagy 2µg/ml DNR -rel (6 óra) kezeltük. A DNR kezelést önmagában, illetve CLA vagy TM előkezeléssel kombinálva alkalmaztuk. Western blot analízishez a sejteket centrifugálással (3000 fordulat/perc, 3 perc) összegyűjtöttük. Ezt követően PBS-sel mostuk, majd újra centrifugáltuk (3000 fordulat/ perc, 3 perc), és a felülúszót eltávolítottuk. A sejtekhez 100RIPA puffert (50 mM Tris-HCl (pH7,4), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 és 0,5 % proteáz inhibitor koktél), valamint 0,1 µM MC-LR-t adtunk, majd 10 perces vízfürdős ultrahangos feltárást követően a lizátumot centrifugáltuk (10 000 g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót egy tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk, majd 5 x SDS mintapuffert adtunk hozzá, és a mintákat 100 °C-on 10 percig főztük.

MCF-7 sejtek

FLAG-KEPI-vel való transzfekció után a sejteket 16 órán keresztül szérummentes médiumban éhezettük, majd 25 nM CLA-val (1 óra) vagy 100 nM PMA (30 perc) kezeltük. A sejteket 100 µl RIPA pufferben, valamint 0,1 µM MC-LR jelenlétében felkapartuk, majd 10 perces vízfürdős ultrahangos feltárást követően a lizátumot centrifugáltuk (10 000 g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót egy tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk, és 5 x SDS mintapuffert adtunk hozzá, majd a mintákat 100 °C-on 10 percig főztük.

HaCaT és NHEK sejtek

A primer NHEK sejtek kítűnő modellként szolgálnak a humán bőrrel foglalkozó kutatások során, azonban a beinduló differenciációjuk következtében hamar elhalnak apoptózissal, így fenntartásuk korlátozott. Ezért munkám során elsősorban HaCaT sejtekkel dolgoztam, amelyekre jellemzőek az NHEK sejtfolymatai, nem szenvednek malignus transzformációt, megnő a proliferációs képességük, azonban csökken a differenciációra való hajlamuk. Az NHEK és HaCaT sejtekkel történő vizsgálatokat 90-100% konfluencia elérése után végeztük el.

siPP1c csendesítést követően, illetve TM kezelést megelőzően a sejteket 16 órán keresztül szérummentes médiumban éhezettük, majd 10 J/cm² UVA-val besugároztuk, ami alkalmanként 30-40 percet vett igénybe a fénycső állapotától függően. A besugárzás után a sejteket aktivitás méréshez azonnal lizáltuk 100 µl jéghideg 0,1 mM EDTA-t, 0,5 % proteáz inhibitor koktélt és 50 mM 2-merkaptóetanolt tartalmazó TBS pufferben. Western blot és immunfluoreszcenciás vizsgálat, valamint RNS és microarray analízis előtt a sejteket 24 óráig inkubáltuk UVA besugárzást követően.

Fluoreszcens *in vitro* gyógyszerérzékenységi teszt

A gyógyszerérzékenységi vizsgálatokat 2 napos sejtenyészeteken végeztük 384-lyukú lemezekon. Minden lyuk 1000 sejtet tartalmazott 300 µl tápoldatban. THP -1 vagy KG-1 sejteket 50 nM CLA-val vagy 1 µM TM-nel előkezeltük (1 óra), amit PBS mosás követett. A Daunorubicin (DNR) hatását 4 koncentrációban (0,15 µM, 0,61 µM, 1,84 µM és 7,38 µM), triplikátumokat alkalmazva vizsgáltuk. 48 órás inkubációt követően az élő és elpusztult sejtek elkülönítésére VitalDye fluoreszcens festéket használtunk. Kontrollként 15 lyuk csak tápoldatban lévő sejteket tartalmazott, amelyekhez 50 nl DMSO-t adtunk, illetve 5 lyuk csak tápoldatban lévő sejteket tartalmazott DMSO nélkül. A két kontrollt összehasonlítva

nem tapasztaltunk DMSO által okozott toxikus hatást, sejtpusztulást. Az élő sejtek számának meghatározásához egy, a stockholmi Karolinska Intézetben (KIVIF) egyedileg kialakított, módosított Perkin-Elmer UltraView LCI automatizált fluoreszcens konfokális mikroszkópot alkalmaztunk. Az élő sejtek számát Count 3.0 programmal határoztuk meg QuantCapture 4.0 program segítségével készült képeken. A programokat OpenLab (Improvisation) háttérrel felhasználva a KIVIF-ben fejlesztették ki. Az átlag túlélést három lyuk átlagából határoztuk meg (Márkász és mtsai., 2006).

Western blot

A sejtekből készített teljes lizátumok fehérje koncentrációjának meghatározásához BCA reagenst használtunk, amelyhez a lizátumokat 1:10 arányban hígítottuk. Standardként RIPA pufferben hígított BSA-t (marha szérum albumin) használtunk, és az oldatok abszorbancia értékeit 540 nm-en ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével detektáltuk.

Az 5x SDS mintapufferben megfőzött mintákból foszfofehérjék analíziséhez ~~100~~ fehérjét, míg az egyéb fehérjék vizsgálatához ~~30~~ fehérjét választottunk el Laemmli (Laemmli, 1970) módszerét alkalmazva 10-15 % akrilamidot tartalmazó gélen Bio-Rad MiniProtean készüléket használva. A géleken elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk Bio-Rad transzfer egységgel 100 V-on 90 percig. A membrán blokkolásához 5 % (m/v) zsírszegény tejport és 0,05 % Tween 20-at tartalmazó PBS oldatot (PBST) alkalmaztunk. 1 órás blokkolást követően a membránokat mostuk, majd PBST-ben hígított (1:500-1:2000) primer antitesttel 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Mosási lépéseket követően a membránokat HRP-konjugált másodlagos antitesttel történő inkubáció követte szobahőmérsékleten, 2 órán át. Az immunreakciókat nagy érzékenységű kemilumineszcencián alapuló oldattal detektáltuk. A foszforilációs helyre specifikus antitestek használata során minden esetben PBS/PBST helyett TBS/TBST puffert alkalmaztunk, amelyben a foszfátot 25 mM Tris-HCl helyettesítette.

Kaspáz-3 aktivitás mérés

Az apoptózis során megnövekedett kaspáz-3 aktivitás meghatározására egy fluorimetriás Caspase-3 Immunoassay/Activity Kit-et alkalmaztunk, ahol egy peptid szubsztrátból, DEVD-AMC konjugátumból történő AMC felszabadulást mértük fluorimetriás módszerrel. 5×10^6 /ml THP-1 sejtet inkubáltunk toxinok nélkül, $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNR -rel (6 óra), 50 nM CLA-val (1 óra), CLA-val és DNR-rel (1 + 6 óra), $1 \mu\text{M}$ TM -nel (1 óra) vagy TM-nel és

DNR-rel (1 + 6 óra). A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd jéghideg PBS-sel történő mosás után 110 µl lízis pufferrel (10 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 20 µg/ml Leupeptin, 5 mM DTT, pH 7,4) lizáltuk. A lizátumot centrifugáltuk és a felülúszóhoz 100 µl 2 µg/µl DEVD-AMC szubsztrátot tartalmazó 2x reakció puffert (200 mM HEPES, 20 % szacharóz, 0,1 % CHAPS, 0,1 % CHAPS, 5 mM DTT, pH 7,25) adtunk. A mintákat 60 percig 37 °C-on inkubáltuk 96-lyukú platen, és a felszabaduló AMC mennyiségét 360 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszak mellett határoztuk meg ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével. Az egyes kezelések azonos sejtszám (~5x10⁶/ml) mellett történtek, illetve meghatároztuk a minták fehérje koncentrációját, amelyre a kaszpáz-3 aktivitás értékeket normalizáltuk.

Életképes, apoptotikus és nekrotikus sejtek detektálása Hoechst festékkel

A kezeléseket követően a THP-1 sejteket (~5x10⁶/ml) háromszor mostuk PBS-el. PBS-ben hígított 10 µM Hoechst 33342 festékkel 15 percig, majd 5 µM propídiium jodiddal (PI) 5 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on, sötétben. A morfológiai vizsgálatokhoz a sejteket poli-L-lizinnel fedett fedőlemezekre helyeztük. PBS-el történő mosást követően a fedőlemezeket ProLong Gold antifade reagenssel rögzítettük. A felvételeket Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) készítettük. A DNR autofluoreszcenciáját a PI emissziójának 710 és 750 nm közötti mérésével küszöböltük ki. A sejtek állapotának meghatározásakor “életképesnek” tekintettük a Hoechst pozitív/PI negatív, normál sejtmagi morfológiát mutató sejteket, “apoptotikusnak” tekintettük a Hoechst pozitív/PI negatív, kromatin kondenzációt, magi fragmentációt, blebbinget mutató sejteket, és “nekrotikusnak” tekintettük a Hoechst pozitív/PI pozitív sejteket. A kísérlet során alkalmanként (n=3) és kezelésként 200 sejt került megszámlálásra, a statisztikai adatok ezek átlagából készültek.

LDH felszabadulás mérése

A nekrotikus sejtek meghatározására „Cytoscan colorimetric assay” módszert alkalmaztunk, és mértük a sérült sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz (LDH) mennyiségét. A kezeléseket követően a sejteket centrifugáltuk (8000 g, 1 perc), majd 50 µl felülúszóhoz 50 µl szubsztrát mixet adtunk (G-Biosciences), 20 percig inkubáltuk 96-lyukú platen, és az abszorbanciát 490 nm-en ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével detektáltuk. Negatív háttér kontrollnak a tenyésztő médiumot használtuk, míg

pozitív kontrollnak (teljes LDH felszabadulás) lízis pufferrel lizált sejteket tekintettük. Az LDH felszabadulást a maximális LDH %-ban adtuk meg.

Metil-tiazol-tetrazólium teszt (MTT assay)

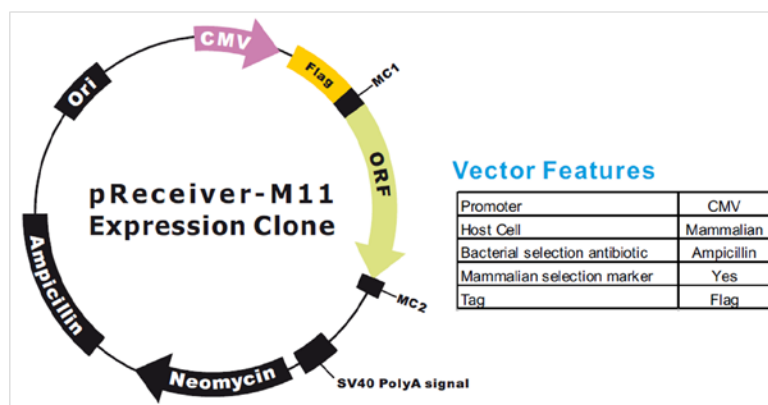
MTT assay-t 96 lyukú plate-n végeztük HeLa sejtek esetében $\sim 10^5$ /ml sejtkoncentrációt alkalmazva, HaCaT sejtek esetében 85-90%-os konfluenciát elérve, és a sejtek életképességének meghatározására használtuk. Az MTT reagens elkészítéséhez 5 mg 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromidot 1 ml PBS-ben oldottunk fel. 48 órával a gén csendesítést követően a médiumot szérumentes médiumra cseréltük (200), és a sejteket UV fényvel besugároztuk. Az UV kezelést követő 24. órában a médiumot újra lecseréltük, ami 1/10 térfogatban tartalmazta az MTT oldatot, és 37 °C-on 1-3 órán át inkubáltuk. Az ép sejtek mitokondriális enzimek képesek az MTT-t formazánná alakítani. A médiumot eltávolítottuk a sejtekről, a formazán zárványokat DMSO-ban feloldottuk, és a kialakuló színintenzitást 450 nm-en fotometráltuk. Az optikai denzitás mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A kezeléseket megelőzően a THP-1 és HaCaT sejteket ($\sim 5 \times 10^6$ /ml) 16 órán keresztül éhezettük szérumentes médiumban, és ez idő alatt a sejtenyészet szinkronizálódott. A THP-1 sejteket 50 nM CLA-val vagy 1 μ M TM-el kezeltük 1 órán keresztül, a HaCaT sejteket pedig 1 μ M TM-el 1 órán át inkubáltuk, és/vagy 10 J/cm² UVA-val sugároztuk be. PBS és 0,1 mM EDTA-t tartalmazó 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl (TBS) oldattal történő mosást követően a sejtekhez 100 μ l jéghideg 0,1 mM EDTA-t, 0,5 % proteáz inhibitor koktélt és 50 mM 2-merkaptoetanolt tartalmazó TBS puffert adtunk. Folyékony nitrogénben való fagyasztás és ultrahangos szonikálás után a lizátumot centrifugáltuk (16.000 g, 10 perc, 4 °C). A felüliszót 0,1 % BSA-t és 0,1 % 2-merkaptoetanolt tartalmazó 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) pufferrel hígítottuk (THP-1 sejtek és HaCaT sejtek 30-szoros véghígítás, HaCaT szubcelluláris frakciók 300-szoros véghígítás), majd 4 μ M His -inhibitor-2 (I-2) vagy 5 nM OA jelenlétében, ill. távollétében 10 percig inkubáltuk. A reakciót a szubsztrát (μ M ³²P-al jelölt miozin könnyű lánc (³²P-MLC20)) hozzáadásával indítottuk, és 2 percig 30 °C-on inkubáltuk, majd 200 μ l 10 % TCA és 200 μ l 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kihalított ³²P_i-ot a kicsapódott fehérjék centrifugálásával (10.000 g, 1 perc) történő elválasztása után 370 μ l felüliszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A foszfatáz aktivitás változását a kontroll mintákhoz hasonlítva (azt 100 %-nak véve) százalékosan adtuk meg.

Flag-KEPI vektor

A Flag-taggel kapcsolt KEPI fehérje expressziójához az EX-T2333-M11 vektort (GeneCopoeia) használtuk. A vektorban található Flag peptidet kódoló szekvencia lehetővé tette az overexpresszált KEPI fehérje detektálását Flag peptid elleni antitesttel. A plazmidot felszaporításra JM109 kompetens E.coli sejtekbe transzformáltuk és ampicillint tartalmazó LB agaron tenyésztettük. A kívánt plazmidot hordozó telepeket 100 ampicillin tartalmozó LB (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0) tápoldatba oltottuk le, majd egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámú rázatás mellett növesztettük. A plazmidokat MaxiPrep kit (QIAGEN) segítségével tisztítottuk. A kitisztított plazmidokat EcoRI és XhoI restriktációs enzimekkel hasítottuk. Az EX-T2333-M11 vektor méretét (5790 bázispár), valamint az ORF méretét (498 bázispár) 1 %-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.



14. ábra Flag-KEPI plazmid. A Flag-KEPI-t kódoló szekvenciát az ORF (open reading frame) jelzi.

Flag-KEPI transzfekció

A sejtek ($\sim 10^6$ /ml) transzfekciójához tisztított Flag-KEPI plazmidot használtunk, és a transzfekciót szuszpenzióban végeztük. Több transzfekciós reagens (FuGENE, Roche; PEI) kipróbálása után a GeneJuice transzfekciós reagens bizonyult a leghatékonyabbnak, és kísérleteinkhez a továbbiakban ezt használtuk. 8 μ l transzfekciós reagenst és 2 μ g tisztított plazmidot 100-100 μ l szérumszintmentes médiumban meghígítottuk. A plazmidot tartalmazó elegyet a transzfekciós reagenst tartalmazó elegyhez cseppenként hozzáadtuk, és az így előkészített premixet 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A premix oldatot 1 ml, FBS-t nem tartalmazó sejszuszpenzióhoz (MCF-7) csepegtettük, és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az overexpresszált Flag-KEPI hatásának vizsgálatához 6 lyukú

tenyésztőedényeket használtunk, amelyekbe lyukanként 1 ml premixet tartalmazó sejtszuspenziót cseppentettünk, és ehhez 1 ml 20 % FBS-t tartalmazó médiumot adtunk. Másnap, a transzfekciós reagenst tartalmazó közeget eltávolítottuk a sejtekről, és friss, 10 % FBS-t tartalmazó médiumot adtunk hozzá, és a sejteket további 48 óráig inkubáltuk.

panPP1c siRNS transzfekció

A HaCaT ($\sim 10^6$ /ml) és HeLa sejtek ($\sim 10^6$ /ml) csendesítését szuszpenzióban végeztük. siRNS és transzfekciós reagens (DharmaFect2) premix oldat elkészítéséhez mindhárom izoformát (PP1 α , PP1 δ , PP1 γ) csendesítő 10 μ l pan PP1c siRNS-t (10 μ M) és 2 μ l transzfekciós reagenst használtunk alkalanként szérummentes médiumban (100 μ l) hígítva. Ezt a premixet csepegtettük 1 ml sejtszuspenzióhoz és inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten, időnként megkeverve. Az inkubációt követően 100 nM végkoncentrációban panPP1c siRNS-t tartalmazó sejt szuszpenziót 6-lyukú tenyésztőedénybe csepegtettük és 1 ml 20 % FBS-t tartalmazó médiummal egészítettük ki. 24 óra múlva a tápoldatot lecseréltük, ezzel eltávolítva a transzfekciós reagenst a sejtekről, és további 24 óráig inkubáltuk a sejteket 10 % FBS-t tartalmazó tápoldatban.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

Az MCF-7 sejteket ($\sim 10^5$ /ml), illetve a HaCaT sejteket ($\sim 10^6$ /ml) szuszpenzióban történő PP1c csendesítés után steril üveg fedőlemezekben növesztettük 10 % FBS-t tartalmazó médiumban, és a kezeléseket megelőzően 16 óráig szérummentes médiumban tartottuk. A lemezeket jéghideg PBS oldattal mostuk, majd 3,7 % paraformaldehid oldattal 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. PBS-sel történő mosás után a sejteket 0,02 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS oldattal permeabilizáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. Az 1 % (v/v) BSA-t tartalmazó PBS oldattal történő 1 órás blokkolás előtt a fedőlemezeket jéghideg PBS oldattal mostuk. Az elsődleges antitesteket 1:100 arányban hígítottuk 0,1 % BSA/PBS oldatban és a fedőlemezeket éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Háromszori PBS-sel történő mosás után 1:200 arányban 0,1 % BSA/PBS oldatban hígított Alexa 488-konjugált anti-nyúl-IgG-vel (zöld) és/vagy Alexa 543-konjugált anti-egér-IgG-vel (piros) antitesttel, és egyes minták esetében Texas Red Phalloidinnal inkubáltuk a fedőlemezekben lévő mintákat 90 percig, amit háromszori PBS-sel történő 10 perces mosási lépés követett. A fedőlemezek rögzítésére és a sejtmagok festésére DAPI-t tartalmazó ProLong Gold Antifade oldatot vagy Slow Fade antifade Kitet használtunk. A mintákat Zeiss Axioskop HBO50/AC mikroszkóppal (60 x nagyítású objektív) vizsgáltuk. A konfokális képeket Leica TCS SP8 konfokális lézer

pásztázó mikroszkóp (Confocal Laser Microscope) segítségével detektáltuk. A felvételeken nem történt módosítás, az egyesített ábrák elkészítéséhez Photoshop képkészítő szoftvert alkalmaztunk.

UV (UVA, UVB) besugárzás

MTT analízishez a kontroll és PP1c csendesített HaCaT sejteket 96 lyukú, míg Western blot analízishez 6 lyukú tenyésztőedényekben növesztettük, PP1c csendesítést követő 48 órás inkubáció után a médiumot 33 μ l szérumentes médiumra cseréltük 96 lyukú edény esetén, míg 1 ml szérumentes médiumra cseréltük 6 lyukú edény esetén, ami egyenlő folyadékoszlop magasságot eredményezett. Az UVA és UVB besugárzásokat a Bio-Sun UV irradiation system (Vilbert Lourmat, Franciaország) készülékkel végeztük el. A műszerrel leadott UVA és UVB besugárzást J/cm²-ben adtuk meg.

Szubcelluláris frakciók készítése HaCaT sejtekből

A sejtmag, citoplazma és citoszkeleton frakciók izolálásához 90%-os konfluenciáig növesztettük a HaCaT sejteket, majd a sejteket PBS-ben óvatosan felkapartuk és centrifugáltuk (1000 g, 4 °C, 5 perc). Hatszoros térfogatú homogenizáló pufferral (0,25 M szacharóz, 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20x proteázgátló koktél) 15-20 áthúzással homogenizáltuk 26G átmérőjű steril orvosi tűvel, majd 0,5% Nonidet P-40-et adtunk hozzá. A sejtlizátumot 10 másodpercig óvatosan vortexszel kevertük. A lizálás hatásfokát tripán kék festékkel történő festéssel ellenőriztük. A lizátumot centrifugáltuk (8000 g, 4 °C, 30 másodperc). Az így kapott üledék sejtmagot és sejttörmeléket tartalmazott. A pelletet háromszoros térfogatú A pufferben (0,25 M szacharóz, 10 mM (pH ,9), 3,3 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT és proteázgátlók) szuszpendáltuk és centrifugáltuk (2000 g, 15 perc, 4 °C). A felülúszót eltávolítottuk és a pelletet 2,5 térfogatnyi B pufferben (a puffer összetétele ugyanaz, mint az A pufferé kivéve, hogy ez 0,35 M szacharózt tartalmazott) újra szuszpendáltuk. A szuszpenziót centrifugáltuk (1100 g, 15 perc, 4 °C), és az így nyert pelletet B pufferben vettük fel, majd ultrahangos kezelésnek (10 pulzussal, 3x30 másodperces intervallum) vetettük alá. A feltárás során kapott szuszpenzió a sejtmag frakció. A 8000 g centrifugálással kapott felülúszót ismét centrifugáltuk (1250 g, 20 perc, 4 °C), és az így kapott felülúszót tovább centrifugáltuk (Bechman Type 65 rotor, 50000 g, 60 perc, 4 °C). A felülúszó megfelel a citoszol frakciónak. Az 1250 g centrifugálás pelletét 1% Nonidet P-40-et tartalmazó homogenizáló pufferben szuszpendáltuk, majd a szuszpenziót tovább centrifugáltuk (50000 g, 60 perc, 4 °C). A pelletet, amely a citoszkeleton frakciónak felel

meg, kétszeres térfogatú RIPA pufferben inkubáltuk 5 percig 4 °C-on Western blot analízishez, vagy 0,5% Nonidet P-40-et tartalmazó homogenizálópufferben tártuk fel (15x5 impulzus) protein foszfatáz aktivitásméréshez.

Állatkísérletek

A kísérleteinkhez 6 hetes, hím, Balb/c (Charles River) egereket használtunk, amelyeket külön ketrecben tartottunk standard laboratóriumi körülmények között 19-25 °C hőmérsékletű, 35-75 % páratartalmú, 12 órás fény/sötét ciklusú szobában. Tiszta víz és az étel *ad libitum* állt rendelkezésre. Minden állatprotokoll az Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (*Institutional Ethics Committee*) (7/2010 DE MÁB) engedélyével és felülvizsgálatával készült. Az egerek hátáról a szőrt az UV és a PP1 inhibitor tautomocinnel (TM, Takai és mtsai., 1995) történő kezelés előtt kereskedelmi forgalomban kapható Veet szőrtelenítő krémmel távolítottuk el, és a bőrfelületeket azonnal mostuk és szárítottuk. 24 órával a szőrtelenítést követően jelöltük meg a bőrfelületeket, ahol a kontroll esetén anionos hidrofil krémmel, a kezelés során anionos hidrofil krémbe oldott tautomocinnel kezeltük az egerek bőrét. Az egereket két csoportra, UVA-val nem besugárzott kontroll csoportra, és UVA-val besugárzott csoportra osztottuk (minden csoportban 8-8 egér volt). 1 órával az UV besugárzás előtt a kijelölt bőrfelületeket bekentük anionos hidrofil krémmel vagy 1 µM tautomocint tartalmazó anionos hidrofil krémmel. Az UVA sugárzáshoz Philips TL-20W/12 lámpával (Philips, Eindhoven, Hollandia) felszerelt készüléket használtunk, ami 315-400 nm hullámhosszúságú sugárzást bocsájtott ki. Az UVA besugárzás alkalmanként 30 percig tartott, öt alkalommal, ami összesen 531 J/cm² jelentett. Cervikális diszlokáció után az egerek bőréről a szubkután zsírréteget eltávolítottuk és a mintákból immunhisztokémiai és Western blot analízist végeztünk.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A kontroll és kezelt egérbőr minták felét azonnal 10 %-os neutrális pufferelt formalinban fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. A 4 µm-es metszeteket fedőlemezekre (Superfrost/plus; A. Daigger & Company, Inc., Vernon Hills, IL) helyeztük, xilollal deparaffináltuk, felszálló alkoholsorral dehidráltuk, amit hematoxin és eosin (H&E) festés követett (Lontay és mtsai., 2010). Keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszon 1b fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatához a metszeteket az adott fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitestekkel (1,5 µg/ml) egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Mosási lépést követően a

mintákat tormaperoxidázzal kapcsolt anti-egér vagy anti-nyúl antitestekkel inkubáltuk, és 3,3'-diaminobenzidin-nikkel (DAB-nikkel, 0,3 mg/ml) színreakcióval tettük láthatóvá az általunk vizsgált fehérjék lokalizációját, illetve mennyiségét. A bőrminták másik felét a szövet homogenizálását követően Western blot analízisre használtuk fel.

Egérbőr minták feltárása

Az egérbőr mintákat a cervikális diszlokáció után azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd lemértük a tömegüket. A mintákhoz a mg-ban mért tömeg tízszeresének megfelelő μ l térfogatú lízis puffert (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,6 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Triton X-100, 20x protiáz inhibitor koktél) adtunk, majd Potter-féle homogenizátorral lizáljuk a sejteket. A teljes lizátumok fehérje koncentrációjának meghatározásához BCA reagenst használtunk, amelyhez a lizátumokat 1:10 arányban hígítottuk. Standardként RIPA pufferben hígított BSA-t (marha szérum albumin) használtunk, és az oldatok abszorbancia értékeket 540 nm-en ELISA Reader (Labsystems Multiscan MS) segítségével detektáltuk.

RNS és microarray analízis adatok elemzése

Génexpressziós vizsgálatokhoz 3 párhuzamos kontroll, panPP1c csendesített, UVA kezelt, illetve kombinált kezelésen (panPP1c csendesített és UVA besugárzott) átesett HaCaT sejtekből RNS izolálást végeztünk. A total RNS preparátumok elkészítéséhez Trizol reagenst (Invitrogen) használtunk a gyártó cég utasításainak megfelelően. A teljes expressziós mintázat analízise Affymetrix GeneChip Rat Gene 1.0 ST array-vel történt. A 250 ng total RNS minta felszaporítására és jelölésére Ambion WT Expression Kit-et (Life Technologies) és GeneChip WT Terminal Labeling and Control Kit-et (Affymetrix) használtunk. A minták 16 óráig 45 °C-on voltak hibridizálva, amit egy standard mosási protokoll követett Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 használatával. Az adatok feldolgozását GeneChip Scanner 7G (Affymetrix) készüléssel végeztük. Az RNS jelölést és hibridizálást a UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd (Debrecen) végezte. A microarray adatok elemzése GeneSpring 12 GX szoftverrel (Agilent BioTechnologies) történt.

Statisztikai elemzés

A statisztikai kiértékeléseket egyutas Anova-val vagy t-próbával végeztük el, ahol $n \geq 3$.

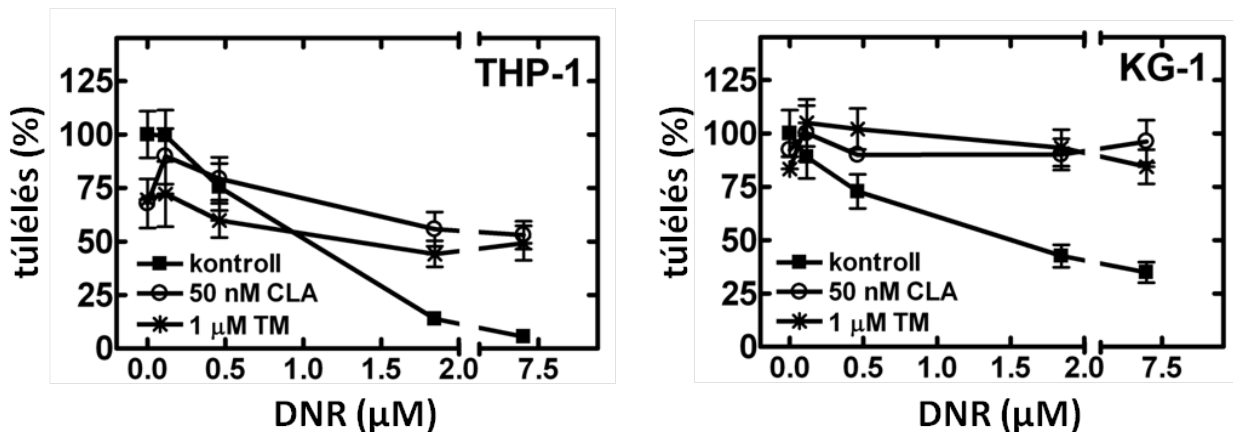
EREDMÉNYEK

Protein foszfatáz inhibitor toxinok és fehérjék hatása a leukémiás sejtek kemoszenzitivitására

Daunorubicin és protein foszfatáz inhibitorok hatása leukémiás sejtek kemoszenzitivitására

Leukémiás sejtek életképességének vizsgálata

Daganatos megbetegedések kezelésénél gyakran előforduló probléma a kemorezisztencia kialakulása, ami a daganatos sejtek túlélését megnöveli, így a terápia hatékonyságát csökkenti. Egyes foszfatáz inhibitorokkal történő kezelések hatása a sejtek életképességére ellentmondásos, apoptózist indukálhatnak (Morimoto és mtsai., 1997), de túlélést is előidézhetnek (Xin és Deng, 2006). Munkacsoportunk (Kiss és mtsai., 2008) korábban kimutatta, hogy leukémiás sejtvonalon (THP-1) a PP2A kalikulin-A-val történő gátlása a daunorubicin indukálta sejthalált részlegesen csökkentette, növelve ezzel a sejtek túlélését. Ezen folyamatok további vizsgálatának céljából a kísérleteket megismételtük THP-1 és KG-1 leukémiás sejtvonalakon, tanulmányozva a PP2A specifikusnak tekintett CLA mellett a PP1 secifikus tautomicin (TM) hatását is eltérő DNR koncentrációknál.



15. ábra CLA és TM hatása THP-1 és KG-1 sejtek túlélésére DNR jelenlétében és távollétében. Az élő sejtek számának meghatározásához automatizált lézer konfokális mikroszkópot használtunk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A THP-1 és KG-1 sejteket 1 órán át előkezeltük CLA (50 nM) vagy TM (1 μM) inhibitor toxinnal, majd további 48 óráig inkubáltuk őket 4 különböző DNR koncentráció (0,15 μM, 0,61 μM, 1,84 μM, 7,38 μM) mellett.

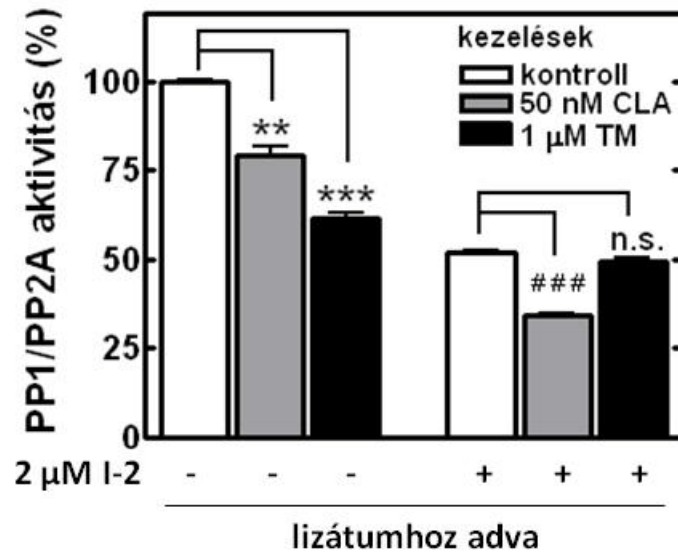
A specificitási megfontolásoknak megfelelően THP-1 és KG-1 sejteket 50 nM CLA-val vagy 1 μM TM-el inkubáltunk 60 percig. A 15. ábrán bemutatott eredmények szerint a CLA és TM

a THP-1 és KG-1 sejtek esetében kismértékű (CLA: THP-1 sejtben 33 %, TM: THP-1 sejtben 30 %; CLA: KG-1 sejtben 7 %, TM: KG-1 sejtben 17 %) sejthalált váltott ki. Ha a sejteket daunorubicinnel (DNR) kezeltük (0,15 μ M, 0,61 μ M, 1,84 μ M, 7,28 μ M), akkor a sejtek életképessége koncentráció-függő módon csökkent. A sejteket 50 nM CLA-val vagy 1 μ M TM-el történő előkezelést (1 óra), majd médiumcserét követően különböző koncentrációjú (0,15 μ M, 0,61 μ M, 1,84 μ M, 7,28 μ M) DNR-rel inkubáltuk 48 órán keresztül, és mértük a sejtek életképességét. Az inhibitor toxinokkal történő előkezelés minden esetben fokozta a sejtek túlélését, így habár az inhibitor toxinok (CLA és TM) önmagukban való alkalmazása is sejthalált indukál, ennek ellenére DNR kezelés során „védő” (relatív túlélést elősegítő) hatásuk is megfigyelhető. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a PP1 és PP2A enzimek aktivitása/gátlása szerepet játszhat a leukémiás sejtek kemoszenzitivitásának szabályozásában.

Protein foszfatáz inhibitor toxinok szelektivitásának ellenőrzése THP-1 sejtekben

Az életképesség vizsgálata során kapott hasonló eredmények, miszerint foszfatáz inhibitor toxinokkal (CLA és TM) történő előkezeléssel a DNR által kiváltott sejthalál csökkenthető, megkérdőjelezi a toxinok specificitását az általunk alkalmazott körülmények között. Ennek tisztázására a kezeléseket követően a sejtek lizátumából foszfatáz aktivitás vizsgálatokat végeztünk 32 P-MLC20 szubsztrát alkalmazásával, mivel azt a PP1 és PP2A egyaránt defoszforilálja. A PP1 és PP2A aktivitásának elkülönítésére inhibitor-2 (I-2) fehérjét használtunk, ami a PP1 specifikus gátlására képes, így az I-2 jelenlétében tapasztalt aktivitás csökkenés a PP1 aktivitását jellemzi, míg a fennmaradó aktivitás a PP2A aktivitásának tekinthető. A sejtlyzátumokban a PP1 I-2-vel történő gátlásának koncentráció függése alapján választottuk a 2 μ M koncentrációt, ami telítési inhibitor koncentrációnak adódott, mivel a PP1 gátlása 0,5-1 μ M koncentrációnál is csaknem teljes volt. Kezeletlen kontroll sejteken I-2-t alkalmazva ~47 % aktivitás csökkenést tapasztaltunk, amiből megállapítható, hogy a PP1 és PP2A közel azonos arányban vannak jelen THP-1 sejtekben. A CLA kezelés az aktivitást a kontroll sejtekhez viszonyítva ~20 %-al csökkentette, és hasonló mértékű (~18 %) csökkenést tapasztaltunk a CLA hatására, ha az aktivitást I-2 jelenlétében határoztuk meg. Mindezekből arra következtettünk, hogy a CLA specifikusan gátolja a PP2A-t. TM kezelések esetében a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva ~62 %-ra csökkent a foszfatáz aktivitás, azonban I-2 jelenlétében a TM nem okoz szignifikáns aktivitás változást. Ez az eredmény pedig alátámasztja azt, hogy a TM szelektíven gátolta a PP1-t. Azonban az is megállapítható, hogy a

sejtek CLA-val és TM-el történő kezelésével csak részleges PP2A és PP1 gátlás váltható ki (16. ábra).



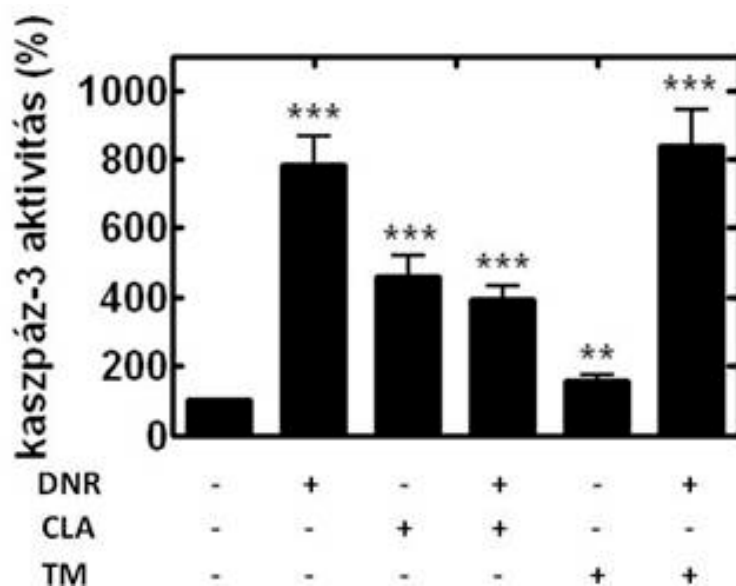
16. ábra CLA és TM specificitásának ellenőrzése

Kezelésenként $\sim 5 \times 10^6$ /ml THP-1 sejtet szérummentes médiumban éhezettük 16 órán át 24-lyukú tenyésztőedényben. A sejteket 50 nM CLA-val (1 óra), 1 μM TM-nel (1 óra) kezeltük, majd mosási és feltárási lépéseket követően 1 μM 32 P-MLC20 szubsztrátot felhasználva mértük a lizátumok foszfatáz aktivitását 2 μM I-2 nélkül, illetve annak jelenlétében. A kezeletlen THP-1 sejtek foszfatáz aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$, n.s. nem szignifikáns, $n=5$

THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitása

Mivel számos apoptotikus folyamat egyik első jeleként kaszpáz-3 aktivitás figyelhető meg, így vizsgáltuk, hogy az inhibitor toxinok önmagukban, illetve DNR-el kombinálva hogyan befolyásolják a kaszpáz-3 aktivitást. Korábban már kimutatták (Kiss és mtsai., 2008), hogy a DNR megnövelte, illetve a PP2A gátlás is befolyásolta a kaszpáz-3 aktivitást. Kísérleteink során megerősítettük ezeket az eredményeket, és vizsgáltuk a PP1 TM-nel történő gátlásának hatását a kaszpáz-3 aktivitásra. A sejteket 50 nM CLA-val, 1 μM TM-nel (egy óra) és/vagy 2 μg/ml DNR -rel (6 óra) kezeltük, majd a sejtek lizátumához a kaszpáz-3 enzim egy peptid szubsztrátját adtuk (DEVD-AMC konjugátum), és mértük az AMC felszabadulást fluorometriás módszerrel. Ha inhibitor toxinnal önmagában kezeltük a sejteket, akkor CLA-val történő inkubáció 4,5-szeresére, míg TM-nel történő kezelés 1,5-szeresére emelte a kaszpáz-3 aktivitást. A DNR kezelés kb. nyolcszorosára emelte a kaszpáz-3 aktivitást THP-1 sejtekben, azonban a CLA előkezelés ezt kb. 50 %-al csökkentette, részlegesen kivédte a DNR által indukált kaszpáz-3 aktivációt. TM-nel történő előkezelés

esetében ezt a védő hatást nem tapasztaltuk, azaz nem következett be kaszpáz-3 aktivitás csökkenés (17. ábra).



17. ábra DNR, CLA és TM hatása THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitására.

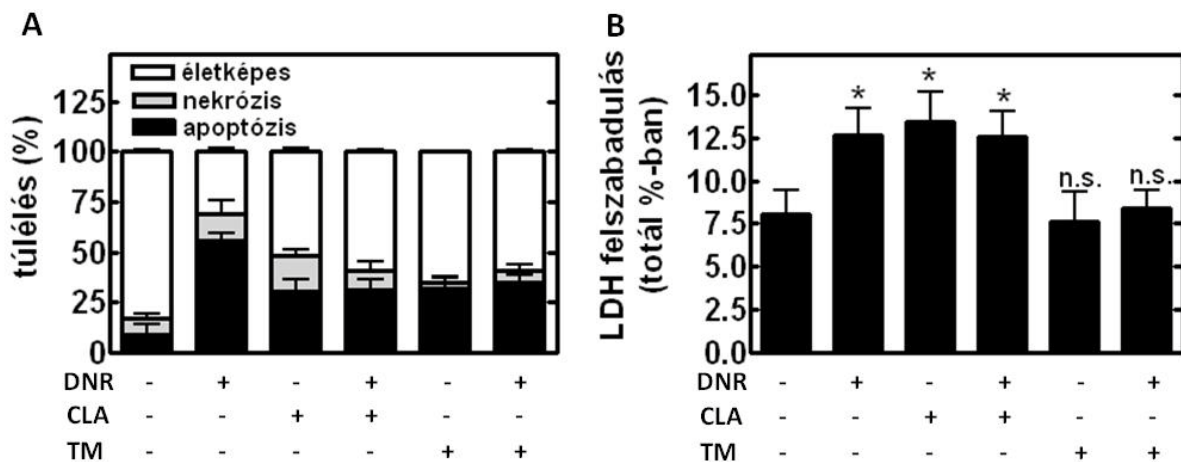
Kezelésenként $\sim 5 \times 10^6$ /ml THP-1 sejtet szérumban éhezettük 16 órán át 24-lyukú tenyésztőedényben. THP-1 sejteket 50 nM CLA-val (1 óra), 1 μ M TM -nel (1 óra) és/vagy 2 μ g/ml DNR-rel (6 óra) kezeltük, majd a lizátumok kaszpáz-3 aktivitását vizsgáltuk. A kezeletlen THP-1 sejtek kaszpáz-3 aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=3$.

A kezelések következtében bekövetkező sejthalál típusának vizsgálata

Az, hogy a TM kezelés csak kismértékű kaszpáz-3 aktivitást eredményezett felvetheti, hogy az általunk tapasztalt életképesség csökkenés nemcsak apoptózis következménye, hanem a sejtek egy része nekrozissal halt el. Mindamellett, hogy irodalmi adatokból is ismert, hogy az apoptózis kaszpáz-3 útvonaltól függetlenül is bekövetkezik foszfatáz inhibitorok hatására (Park és mtsai., 2007), Hoechst 33342 festéket használva morfológiai jelek alapján (kromatin kondenzálódás, blebbing, magi fragmentáció) kívántuk vizsgálni az apoptotikus sejtek arányát (18. A ábra), valamint a nekrozis mértékét a laktát-dehidrogenáz (LDH) felszabadulás (18. B ábra) mennyiségéből határoztuk meg.

A két mérési eredményt összevetve megállapítottuk, hogy a kezeletlen kontroll sejtekben az apoptotikus sejtek aránya ~ 12 %, míg nekrozis a sejtek ~ 8 %-ban következett be. A DNR kezelés során az apoptotizáló sejtek aránya ~ 55 %-ra emelkedett, míg az LDH felszabadulás kis mértékben nőtt, ami azonban a sejtmembrán integritásának elvesztése miatt kései apoptózis során is bekövetkezik. CLA kezelés a sejtek ~ 30 %-ban váltott ki apoptózist,

illetve a nekrotikus sejtek mennyisége közel megegyezett a DNR által kiváltott nekrozis mértékével. A CLA-val történő előkezelés a nekrozis mértékét nem befolyásolta, de az apoptotizáló sejtek arányát ~32 %-ra csökkentette. TM a sejtek ~32 %-ban okozott apoptózist. Akárcsak a CLA előkezelés esetében, TM-nel történő előinkubáció is csökkentette, ~55 %-ról ~35 %-ra a DNR által kiváltott apoptózist. A nekrozist (LDH felszabadulást) tekintve nem tapasztaltunk változást a kontroll sejtekhez képest, sem akkor, amikor a TM-t önmagában, sem akkor, amikor DNR kezeléssel kombinálva alkalmaztuk. Eredményeink arra mutatnak, hogy a sejtek CLA, TM, DNR és kombinált kezelések során elsősorban apoptózissal halnak el.



18. ábra Életképes, apoptotikus és nekrotikus sejtek arányának meghatározása DNR, CLA és TM kezelést követően

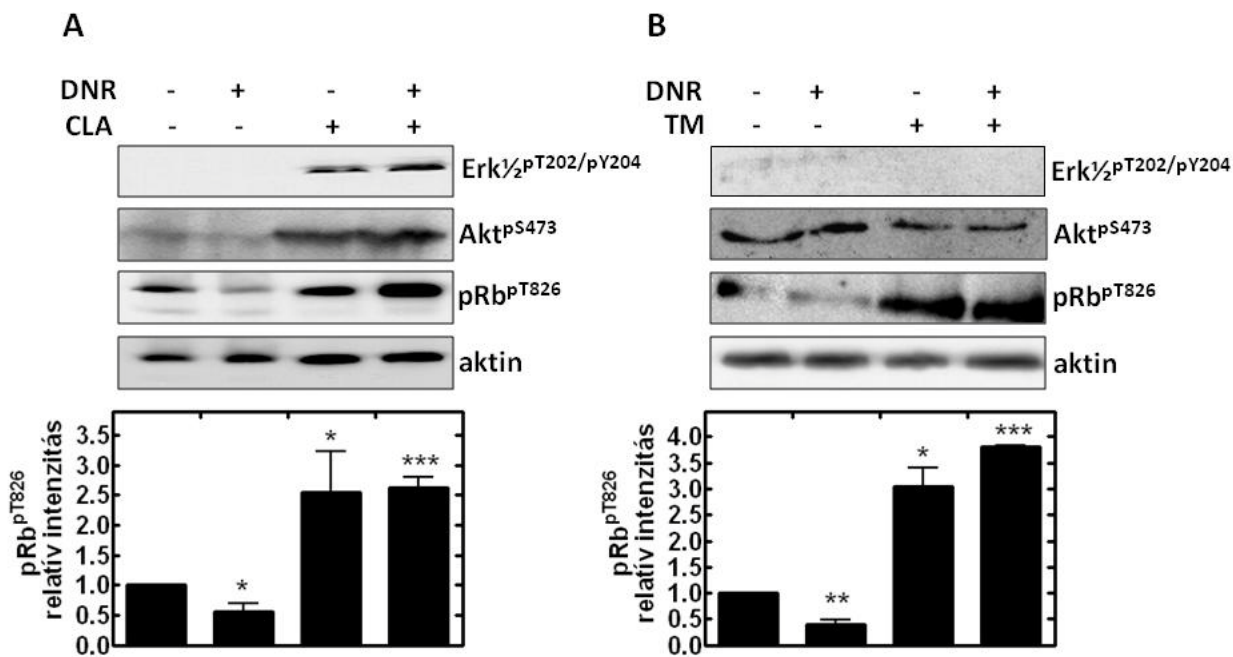
Kezelésenként $\sim 5 \times 10^6$ /ml THP-1 sejtet szérumban éhezettünk 16 órán át 24-lyukú tenyésztőedényben. A sejteket 50 nM CLA-val (1 óra), 1 μ M TM-nel (1 óra) és/vagy 2 μ g/ml DNR-rel (12 óra) kezeltük, majd 10 μ M Hoechst 33342 és 5 μ M propidium jodid festést követően (A), illetve LDH felszabadulást vizsgálva (B) határoztuk meg az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. LDH felszabadulás során a lizált sejtek (pozitív kontroll) LDH mennyiségét tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: * $p < 0.05$, n.s. nem szignifikáns, $n = 3$.

Az, hogy a PP1 és PP2A enzimek gátlása eltérő hatással van a DNR által indukált kaszpáz-3 aktivitásra, azt is feltételezi, hogy a PP1 és PP2A eltérő jelátviteli útvonalak aktivációjában vesz részt a DNR által kiváltott apoptózis során. Ennek tanulmányozására és molekuláris hátterének felderítésére a túlélési útvonalakban részt vevő fehérjék foszforilációs állapotának vizsgálatát is elvégeztük Western blot analízissel.

CLA, TM és DNR kezelés hatása a túlélésben/apoptózisban részt vevő fehérjék foszforilációjára

Az ismert tény, hogy a túlélés elősegítésében szerepet játszó fehérjék (Erk1/2, Akt, pRb) aktivitását a fehérjék foszforilációs állapota befolyásolja, ezért vizsgáltuk, hogy a CLA és TM hogyan befolyásolja az Erk1/2, Akt és pRb foszforiláltságát (19. ábra).

Az Erk1/2 fehérje a kezeletlen kontroll és DNR kezelt (6 óra) THP-1 sejtekben foszforilálatlan állapotban található, azonban CLA kezelést/előkezelést (1 óra) követően megnövekedett mennyiségű foszfo-Erk1/2 fehérjét detektáltunk Western blot analízissel. Egy alap Akt foszforilációs szintet tapasztaltunk kezeletlen kontroll és DNR kezelt sejtekben, amit a CLA kezelés/előkezelés tovább növelt. A pRb fehérje Thr826 aminosav oldalláncának ciklin D/CDK4 kináz komplex általi foszforilációja (Zarkowska és Mittnacht, 1997) a túlélést segíti elő, hiszen szabályozza az E2F1 transzkripciós faktor kötődését/disszociációját (Rubin és Mittnacht, 2001). Defoszforilációját PP2A és PP1 enzimek katalizálják (Kiss és mtsai., 2008; Kolupaeva és Janssens, 2013). THP-1 kontroll, kezeletlen sejtek részleges pRb^{Thr826} foszforilációs szintjét a DNR kezelés csökkentette, míg a CLA előkezelés jelentősen növelte, amely megnövekedett érték CLA előkezelést követő DNR-rel történő inkubáció után sem változott szignifikánsan (19. A ábra). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az Erk1/2, Akt és pRb fehérjék foszforilációs állapotának szabályozásában jelentős szerepe van a PP2A-nak, ami tükröződhet a THP-1 sejtek túlélésében is. Vizsgálatainkat a CLA-t TM-nel helyettesítve is megismételtük, amely által a PP1 szerepét kívántuk tanulmányozni a fenti folyamatokban. Kísérleteink azonban eltérő eredményt mutattak. A PP1 gátlása TM-el nem növelte meg sem az Erk1/2, sem az Akt fehérjék foszforilációs szintjét önmagában vagy DNR kezeléssel együtt alkalmazva sem. Ezzel szemben a pRb Thr826 oldallánc alap foszforiláltsági szintje szignifikáns növekedést mutatott TM kezelést követően DNR távollétében és jelenlétében is (19. B ábra). Az Akt és Erk1/2 esetében a kezeléseket követően nem változott meg a fehérjék expressziós szintje (eredmények nem kerülnek bemutatásra), azonban DNR kezelés hatására pRb degradáció következik be (Kiss és mtsai., 2008), így belső kontrollként aktin fehérjét használtunk. Eredményeink feltételezik, hogy a pRb defoszforilációjának PP1 és PP2A általi szabályozása közös pont lehet a DNR kezelés által kiváltott sejthalál kivédésében THP-1 sejtekben, ez a tény figyelmünket a foszfo-pRb szabályozásának tanulmányozására irányította.



19. ábra CLA és TM inhibitor toxinok hatása különböző fehérjék foszforilációjára (Erk1/2, Akt, pRb) THP-1 sejtekben.

Kezelésenként $\sim 5 \times 10^6$ /ml THP-1 sejtet szérummentes médiumban éhezettük 16 órán át 24-lyukú tenyésztőedényben. THP-1 sejtekben vizsgáltuk 50 nM CLA (1 óra) és/vagy 2 μ g/ml DNR (6 óra) (A), illetve 1 μ M TM (1 óra) és/vagy 2 μ g/ml DNR (6 óra) (B) hatását az Erk1/2, Akt és pRb foszforilációjára anti-Erk1/2^{pT202/pY204}, anti-Akt^{pS473} és anti-pRb^{pT826} antitesttel. A géltre felvitt fehérje mennyiségek összehasonlítására aktin kontrollt használtunk. A pRb^{pT826} denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n \geq 3$.

CLA és TM kezelés hatása PPI inhibitor fehérjékre

Az irodalomból ismert, hogy a pRb defoszforilációját a különböző PPIc izoformák mellett PPIc katalitikus alegységet tartalmazó holoenzimek is defoszforilálhatják (Nelson és mtsai., 1997; Rubin és mtsai., 2001). Az egyik regulátor alegység meghatározásában munkacsoportunk is részt vett, kimutatták, hogy a miozin foszfatáz (MP) szabályozni képes a pRb foszforilációs szintjét (Kiss és mtsai., 2008). Mivel a MP aktivitásának/PPI gátlásának szabályozása a MP MYPT1 regulátor alegységén található gátló helyek (Thr696 és Thr853) inhibitor toxinokkal előidézett foszforilációja mellett inhibitor fehérjéken keresztül is történhet, ezért a daganatos kezeletlen kontroll sejtekben tapasztalt magas fehérjefoszforilációs szintek miatt felvetődik annak a lehetősége, hogy a daganatos sejtben a PPI bizonyos fokig eleve gátolva van, és ebben PPI specifikus fehérje inhibitoroknak lehet szerepe. Ennek tükrében megvizsgáltuk, hogy THP-1 sejtekben jelen vannak-e foszforilációfüggő szabályozó/inhibitor fehérjék (CPI-17, KEPI).



C

17kDa PKC által aktivált inhibitor (CPI-17)

Query 1 ARV**T**VKYDRREL 12
ARVTVKYDRREL
Sbjct 35 ARV**T**VKYDRREL 46

protein kináz C aktivált gátló fehérje (KEPI)

Query 3 **V**TVKYDRREL 12
VTVKYDR+EL
Sbjct 72 **V**TVKYDRKEL 81

20. ábra MYPT1 és KEPI foszforilációja THP-1 sejtekben.

Kezelésenként $\sim 5 \times 10^6$ /ml THP-1 sejtet szérummentes médiumban éhezettük 16 órán át 24-lyukú tenyésztőedényben. A: A MYPT1 foszforilációját a Thr696 és Thr853 oldalláncokon 50 nM CLA (1 óra) és 1 μ M TM (1 óra) kezelést követően anti-MYPT^PT696 és anti-MYPT^PT853 antitestekkel mutattuk ki. A géltre felvitt mennyiségek összehasonlítására anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ antitesttel detektált MYPT1 kontrollt használtunk. B: A KEPI fehérje jelenlétét THP-1 sejtekben anti-KEPI antitesttel mutattuk ki. A KEPI gátló helyen történő foszforilációját anti-CPI-17^PT38 antitesttel detektáltuk. Az anti-CPI-17^PT38 antitest a KEPI^{T73} gátló foszforilációs helyet is felismeri. A géltre felvitt mennyiségek összehasonlítására aktin kontrollt használtunk. C: A CPI-17 és a KEPI fehérjékben a foszforilációs hely környezetének szekvenciája.

Megerősítettük azokat az eredményeket, miszerint a PP2A, így a defoszforilációs folyamatok CLA általi gátlása megnöveli a MP MYPT1 regulátor alegység gátló helyeinek (Thr696 és Thr853) foszforilációját, illetve tanulmányoztuk, hogy az általunk alkalmazott TM kezelés hatására is bekövetkeznek-e ezek a foszforilációs változások. Az egy órás TMM(1 inkubáció hatására nem tapasztaltunk foszforilációs szint emelkedést a MYPT1 gátló helyein (20. A ábra). MP gátlása azonban történhet inhibitor fehérjéken (CPI-17, KEPI) keresztül is, így THP-1 sejtekben tanulmányoztuk, és kimutattuk a CPI-17 családba tartozó KEPI fehérje jelenlétét. A KEPI fehérje azonban foszforilált (foszfo-Thr73) állapotban képes a PP1 fehérjék gátlására, így vizsgáltuk, hogy a CLA és/vagy TM kezelés hatására foszforilálódik, azaz gátló hatásának kifejtésére képessé válik a KEPI. Tapasztalataink alapján a KEPI már kezeletlen sejtekben is kismértékben foszforilált a gátló hatás kiváltásához szükséges

oldalláncon (Thr73), ez a foszforiláció jelentősen növekszik a sejtek CLA kezelését követően, míg a TM kezelés következtében nem tapasztaltuk a gátló aminosav oldallánc foszforilációs szint növekedését (20. B ábra). A KEPI^{pT73} azonosítása anti-CPI-17^{pT38} antitesttel történt, amely korábbi irodalmi adatok szerint lehetséges (Erdődi és mtsai., 2003) a két fehérje nagyfokú szekvencia azonossága alapján a foszforilációs hely környezetében. (20. C ábra).

KEPI fehérje szabályozó szerepének tanulmányozása a pRb fehérje foszforilációjára

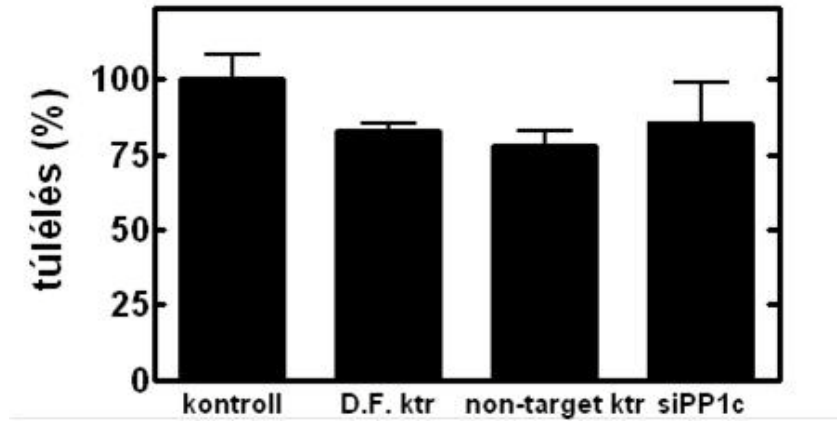
Annak ismeretében, hogy a MP szabályozza a pRb defoszforilációját (Kiss és mtsai., 2008), illetve hogy a KEPI fehérje képes gátolni a MP aktivitását (Erdődi és mtsai., 2003), felmerült a kérdés, hogy a KEPI fehérje részt vesz-e a pRb defoszforilációjának szabályozásában.

THP-1 sejtek transzfekciója Flag-KEPI fehérjével

A KEPI fehérje további tanulmányozása érdekében egy Flag-taggal ellátott KEPI plazmidot kívántunk THP-1 sejtekbe transzfektálni. Több transzfekciós reagens: DNS arányt is kipróbáltunk, azonban kellő mértékű transzfekciót nem tudtunk elérni, így további kísérleteinkhez más sejt vonalakat használtunk.

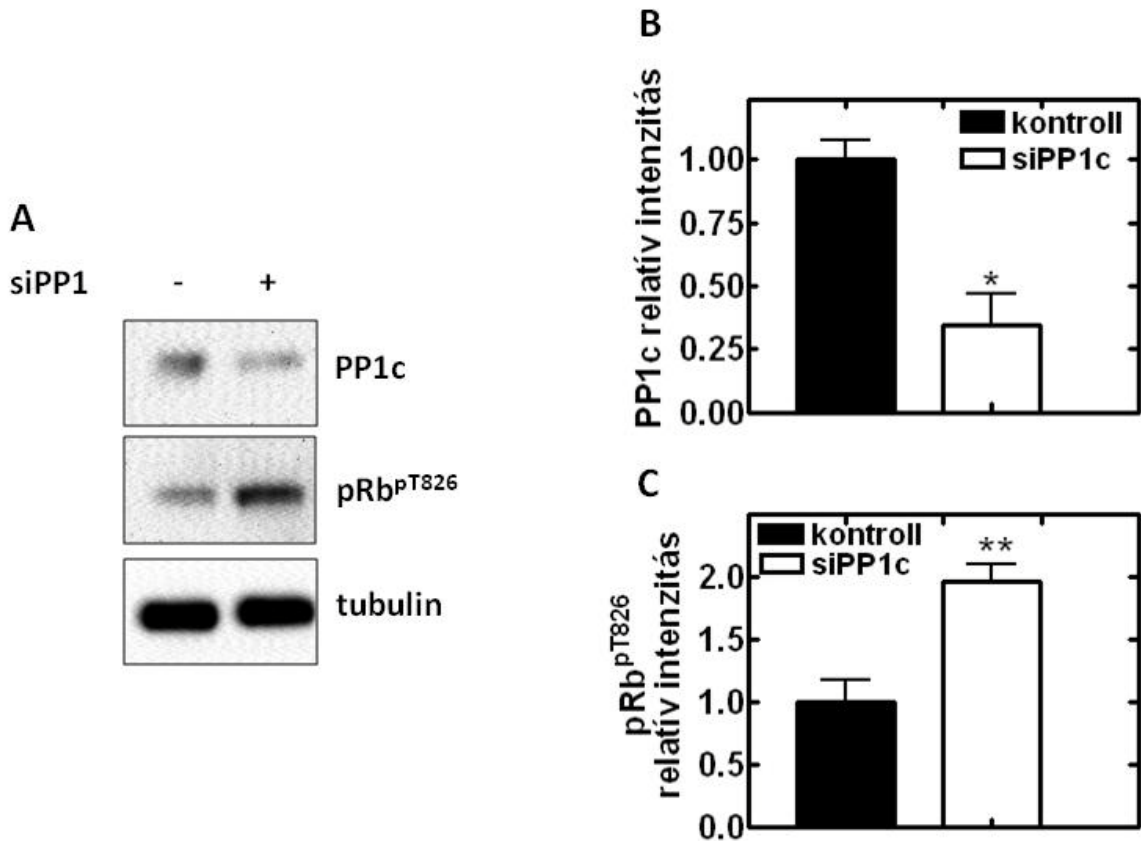
HeLa sejtek csendesítése siRNS technikával

A THP-1 sejtek sikertelen transzfekcióját követően HeLa sejtekben csendesítettük a különböző PP1c izoformákat siRNS technikát alkalmazva, hogy vizsgáljuk a PP1 hiányának vagy alacsony jelenlétének milyen hatása van a pRb fehérje foszforilációjára. Kísérleteink során a mindhárom izoformát (PP1 α , PP1 γ , PP1 δ) csendesítő panPP1c siRNS-t használtuk. MTT assay-vel ellenőriztük a kezelt sejtek életképességét, és a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a transzfekciós reagens kontroll (DharmaFect2, D.F. ktr), a non-target kontroll és a csendesített sejtek (siPP1c) között (21. ábra).



21. ábra PP1 csendesítés hatása a sejtek túlélésére HeLa sejtekben.

HeLa sejtekben csendesítettük a PP1c izoformákat. A kontroll kezeltlen sejtek életképességét tekintettük 100 %-nak, ahhoz viszonyítottuk a transzfekciós reagens kontroll (D.F. ktr), a non-target kontroll (non-target ktr) és a PP1c csendesített (siPP1c) sejtek életképességét.



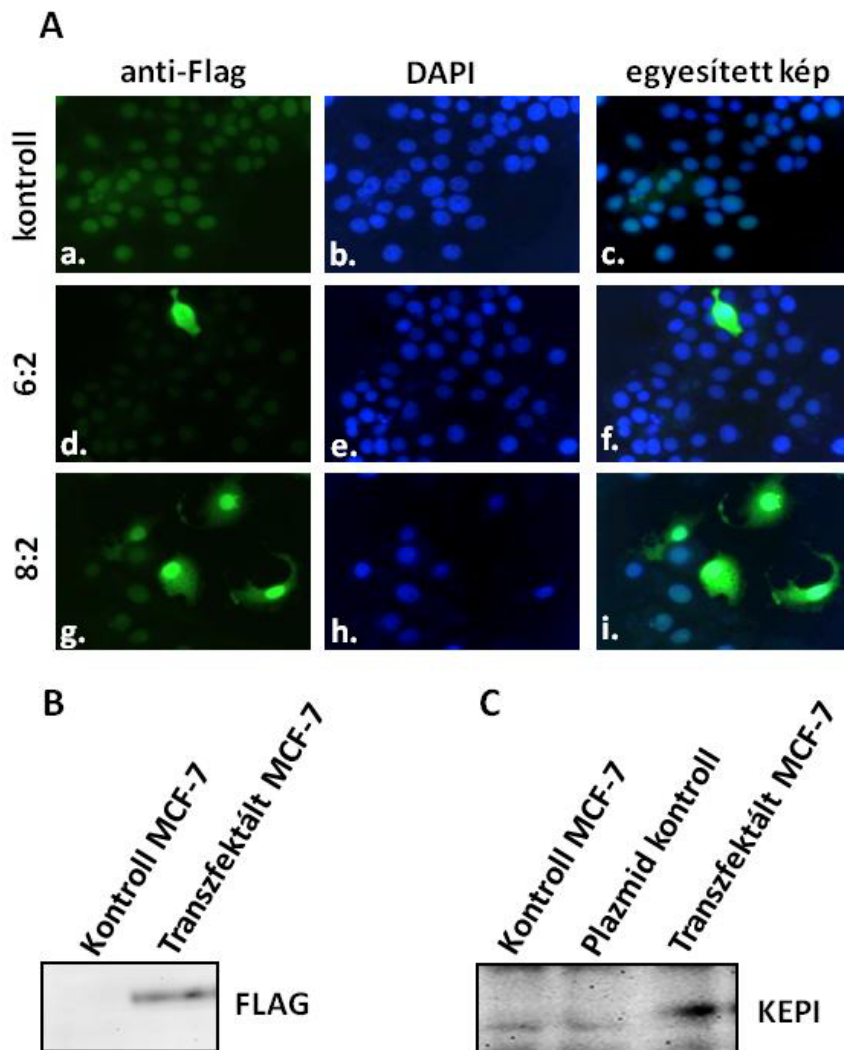
22. ábra PP1 csendesítés hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára HeLa sejtekben.

A PP1c csendesítését követően (Izd. „Anyagok és módszerek” fejezet), 48 óra poszttranszfekciós idő elteltével a PP1c fehérje mennyiségének és a retinoblasztóma foszforilációs szintjének változását Western blot analízissel detektáltuk (A). A PP1c/tubulin (B) és pRb^{pT826}/tubulin (C) denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 3$

A csendesítés hatékonyságát Western blot analízissel ellenőriztük (22. A ábra felső sáv), illetve denzitometrálással meghatároztuk a relatív PP1c expressziót, ami több mint a felére csökkent PP1c csendesítést követően (22. B ábra). Megvizsgáltuk, hogy a PP1c csökkenés megnöveli-e a pRb Thr826 oldalláncának foszforilációját, ami tovább bizonyítaná a PP1c szerepét a pRb fehérje Thr826 aminosav oldallánc foszforilációjának szabályozásában. Western blot kísérlet során a csökkent PP1c expressziós szinttel párhuzamosan emelkedett pRb^{pT826} szintet tapasztaltunk (22. A ábra középső sáv), amit a denzitometriás analízis is megerősített (22. C ábra). A csökkent PP1c mennyiség okozta pRb foszforiláció emelkedés tanulmányozása mellett vizsgáltuk az overexpresszált KEPI fehérje okozta változásokat is.

MCF-7 sejtek transzfekciója Flag-KEPI plazmiddal

Overexpresszált KEPI fehérje hatásainak tanulmányozására ideális modellként szolgál az MCF-7 emlőtumor sejtvonal, hiszen ezek a sejtek nem tartalmazznak KEPI fehérjét (Wenzel és mtsai., 2007). Több transzfekciós reagens: DNS arányt kipróbálva Flag-KEPI konstruktot transzfektáltunk a sejtekbe, és a transzfekció hatékonyságát immunfluoreszcens kísérletekkel ellenőriztük. A szuszpenzióban történő transzfektálás és 48 órás poszttranszfekciós idő letelte után a sejteket a fedőlemezekre fixáltuk és Flag-re specifikus antitesttel jelöltük, majd fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk. A 23. A ábra alapján a 6:2 transzfekciós reagens:DNS arány mellett már detektáltunk transzfektált sejteket (*d, f, zöld*), azonban a transzfekciós reagens mennyiségét tovább növelve a 8:2 transzfekciós reagens:DNS arány kb. 50 %-os hatékonyságot eredményezett (*g, i, zöld*). Mivel ilyen fokú transzfekció is elegendő volt ahhoz, hogy az expresszált Flag-KEPI fehérje hatása érvényesüljön, így minden további kísérletnél ezt az arányt használtuk. A transzfekció mértékét Western blot analízissel is ellenőriztük. Két antitestet, anti-Flag-et (23. B ábra) és anti-KEPI-t (23. C ábra) is használtunk, így nemcsak a transzfekció hatékonyságát ellenőriztük, hanem az anti-KEPI antitesttel arról is meggyőződünk, hogy az MCF-7 sejtek valóban nem tartalmazznak KEPI fehérjét.



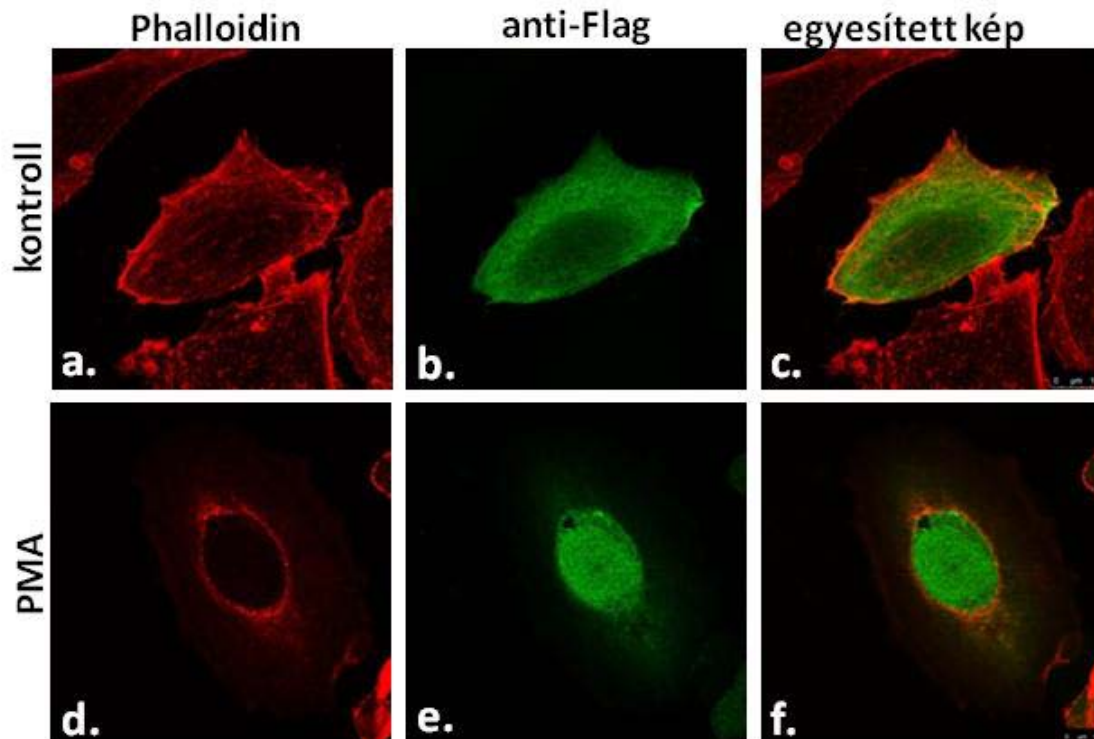
23. ábra Flag-KEPI overexpressziója MCF-7 sejtekben.

Az MCF-7 sejtek ($\sim 10^5$ /ml) transzfekcióját szuszpenzióban végeztük különböző transzfekciós reagens (μ l):plazmid (μ g) arány mellett, majd 48 óra poszttranszfekciós idő leteltével a transzfekció hatékonyságát immunfluoreszcenciás mikroszkóppal ellenőriztük (A). A sejteket fixálás után anti-Flag antitesttel (a, d és g, zöld) jelöltük, a sejtmagokat DAPI-val festettük (b, e, és h, kék) és a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. Az egyesített képek (c, f és i) a transzfekció hatékonyságát mutatják. A transzfekció sikerességét Western blot analízis (B, C) során anti-Flag (B) és anti-KEPI (C) antitestekkel ellenőriztük. Kontrollnak a nem transzfektált (Kontroll MCF-7) csak transzfekciós reagenssel inkubált, valamint a transzfekciós reagens nélkül, csak Flag-KEPI plazmiddal (plazmid kontroll) inkubált sejteket tekintettük.

Flag-KEPI lokalizációjának megváltozása PMA kezelés hatására MCF-7 sejtekben

Mivel a pRb fehérje a sejtmagban található, a KEPI-n keresztül zajló szabályozáshoz a KEPI fehérjének feltehetően jelen kell lennie a sejtmagban. Ahhoz, hogy a KEPI és pRb közti kapcsolatot igazoljuk, a KEPI lokalizációjára irányuló kísérletet végeztünk el. Az ismert, hogy a KEPI fehérje foszforilációjára több kináz (pl. PKC, PKA, ROK, ILK) is képes (Erdődi és mtsai., 2003; Eto és Brautigen, 2012), azonban a gátló hely foszforilációját főleg a PKC

végzi. Így forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) történő inkubáció a PKC aktivációjához és ezáltal megnövekedett KEPI foszforilációhoz vezet.



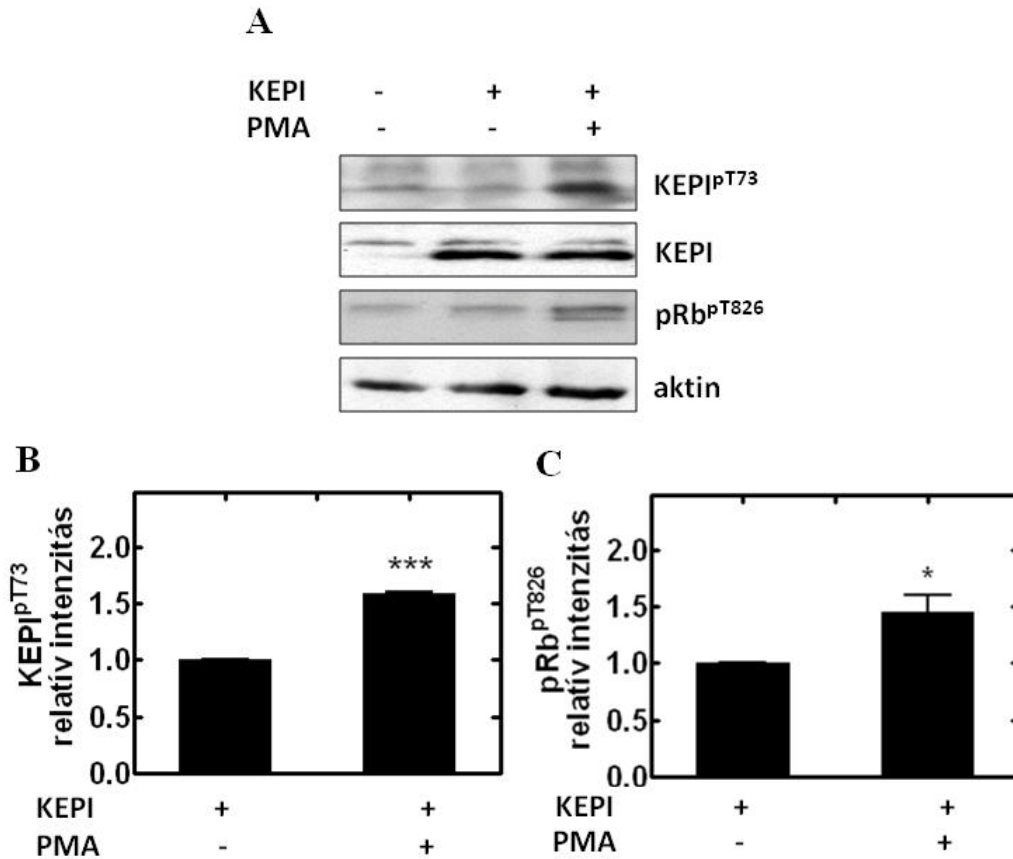
24. ábra KEPI lokalizációja transzfektált MCF-7 sejtekben.

Az MCF-7 sejteket ($\sim 10^5/\text{ml}$) szuszpenzióban transzfektáltuk Flag-KEPI plazmival, majd 48 óra poszttranszfekciós idő után 16 óráig éhezettük szérumentes médiumban. Az MCF-7 sejteket inkubáltuk effektor nélkül (*a-c*), illetve 100 nM PMA jelenlétében 30 percig (*d-f*). Fixálást követően a sejtekben az F-aktint TexasRed-phalloiddinnel (*a és d, piros*), a KEPI fehérjét anti-Flag (*b és e, zöld*) antitesttel jelöltük és konfokális mikroszkóppal detektáltuk. Az egyesített képeken (*c és f*) a Flag-KEPI kezelést követő megváltozott lokalizációja látható.

Flag-KEPI transzfektált sejteket 48 óra poszttranszfekciós idő elteltével 100 nM PMA-val inkubáltuk (30 perc), majd a sejteket fixáltuk a fedőlemezen és Flag-re specifikus antitesttel és F-aktint felismerő TexasRed Phalloiddinnel jelöltük a mintákat. Az immunreakció detektálására fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk. Az overexpresszált KEPI fehérje eloszlását a 24. ábra mutatja. A kontroll sejtekben (*a-c*) a KEPI főleg a citoplazmában lokalizálódik (*b, zöld*), azonban PMA kezelést (*d-f*) követően a KEPI fehérjét elsősorban a sejtmagban (*e, zöld*) detektáltuk. A foszforilált, azaz aktivált KEPI sejtmagba történő transzlokációja hozzájárulhat a foszfo-pRb fehérje szabályozásához.

PMA által aktivált KEPI hatása a pRb foszforilációjára MCF-7 sejtekben.

A 24. ábrán bemutatott PMA által indukált KEPI transzlokáció mellett vizsgáltuk a PMA kezelés hatására bekövetkező KEPI és pRb foszforilációt Western blot analízissel.



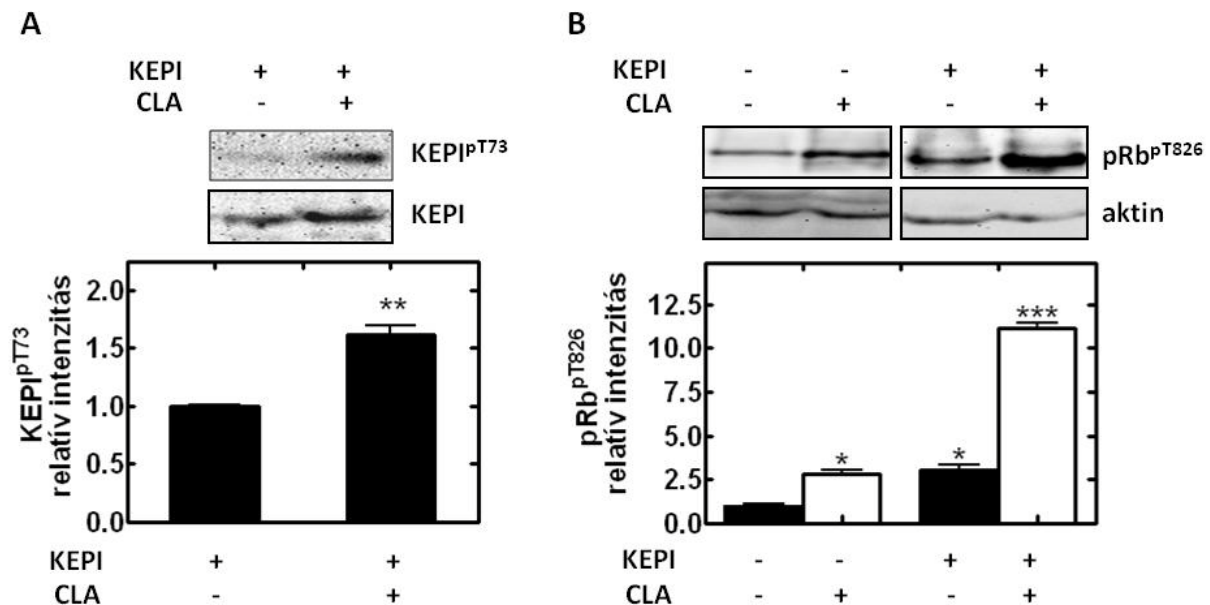
25. ábra PKC aktiváció hatása a KEPI és pRb foszforilációjára MCF-7 sejtekben.

Kontroll MCF-7 sejteket és Flag-KEPI transzfektált MCF-7 sejteket 16 óra szérumeheztetést követően effektor nélkül vagy 100 nM PMA jelenlétében (30 perc) inkubáltuk. A sejtek lízisét követően a mintákat Western bloton anti-KEPI^{pT73}, anti-KEPI, anti-pRb^{pT826} és anti-aktin antitestekkel analizáltuk (A). A KEPI^{pT73}/KEPI (B) és pRb^{pT826}/aktin (C) denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: *p<0,05, ***p<0,001, n=3.

A minták lizátumát anti-KEPI, anti-KEPI^{pT73}, anti-pRb^{pT826} és aktin antitesttel inkubáltuk. A transzfecció sikerességét a 25. A ábra 2. sáv bizonyítja, hiszen a nem transzfektált kontroll sejtekben nem detektáltunk KEPI fehérjét, míg a transzfektált sejtekben határozott sáv látható. A nem transzfektált, illetve a transzfektált, de PMA kezeletlen sejtekben nem tapasztaltunk KEPI foszforilációs szint emelkedést, azonban a 100 nM PMA (30 perc) kezelés kb. 1,5-szeresére növelte a KEPI^{pT73} mennyiségét (25. A ábra felső sáv; 25. B ábra). A PMA kezelés hatására megnövekedett a KEPI fehérje gátló oldalláncának (Thr73) foszforilációs szintje, amivel párhuzamosan fokozott pRb^{pT826} szintet detektáltunk (25. A ábra 3. sáv; 25. C ábra).

CLA kezelés hatása a KEPI és pRb fehérjék foszforilációjára MCF-7 sejtekben

A 24. és 25. ábra alapján feltételezzük, hogy a PMA által aktivált PKC megnöveli a KEPI gátló helyének (Thr73) foszforilációját, aminek hatására a KEPI a sejtmagba transzlokálódik, és ott szabályozza a pRb defoszforilációját.



26. ábra CLA hatása a KEPI és pRb fehérjék foszforilációjára Flag-KEPI-vel transzfektált MCF-7 sejtekben.

Flag-KEPI transzfektált és kontroll sejteket 16 óra szérumeheztetés után effektor nélkül és 25 nM CLA jelenlétében (1 óra) inkubáltuk. A sejtek lízisét követően a mintákat Western bloton anti-KEPI és anti-KEPI^{pT73} antitestekkel analizáltuk. A KEPI^{pT73}/KEPI arány kvantitatív analizését denzitometrálással végeztük el. Szignifikáns változás: **p<0,01 (A). Nem transzfektált és Flag-KEPI-vel transzfektált MCF-7 sejteket szérumeheztettünk, majd 25 nM CLA-val (1 óra) kezeltünk. A sejtek lizátumát Western bloton anti-pRb^{pT826} és anti-aktin antitestekkel analizáltunk. A pRb^{pT826}/aktin arány denzitometriás analizését az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: *p<0,05, ***p<0,001, n=3.

Ahogy azt a 20. ábra is mutatja, CLA (50 nM, 1 óra) kezelés is KEPI aktivációt, azaz a Thr73 aminosav oldallánc foszforilációját eredményezte THP-1 sejtekben, így megvizsgáltuk, hogy MCF-7 sejtek CLA-val történő inkubációja kiváltja-e az overexpresszált KEPI fehérje foszforilációját és aktivációját, és ezáltal a pRb^{pT826} foszforilációs szint emelkedését.

MCF-7 sejteket transzfektáltunk Flag-KEPI-vel, majd 25 nM CLA-val inkubáltuk (1 óra), mivel a transzfekciót követően a sejtek érzékenyé váltak 50 nM CLA-val történő kezelésre. A 25 nM koncentráció is biztosítja a PP2A szelektív, de részleges gátlását. A transzfekció sikerességét Western blot analízissel detektáltuk (26. A ábra alsó rész). CLA-val történő kezelés hatására aktiválódott a transzfektált KEPI, azaz megnövekedett a Thr73 aminosav oldallánc foszforilációs szintje (26. A ábra felső rész). Miután megbizonyosodtunk

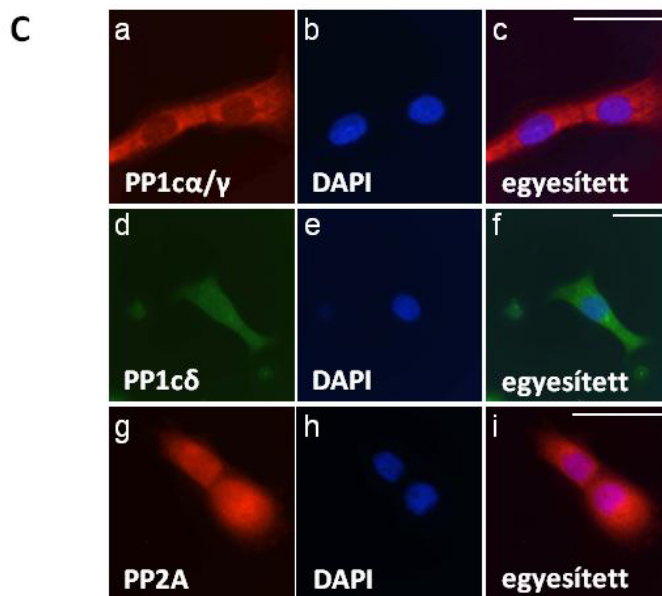
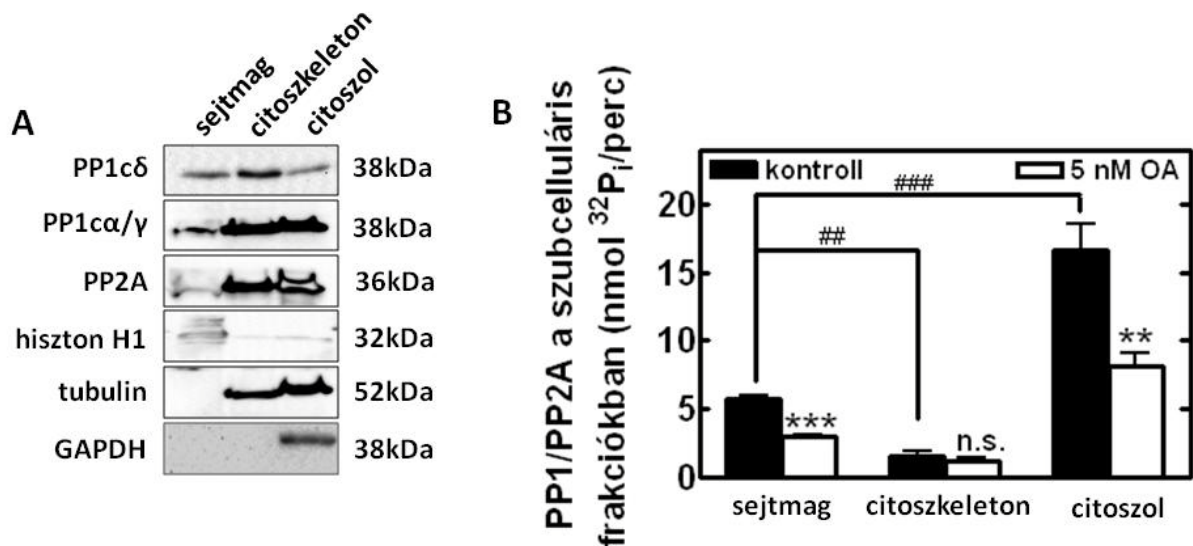
arról, hogy MCF-7 sejtekben is aktiválódik a KEPI CLA kezelés hatására, vizsgáltuk a pRb^{pT826} foszforilációs szintjét is. A CLA kezelés nem transzfektált sejtekben is megnövelte a pRb^{pT826} foszforilációt (26. B ábra bal oldal), azonban ezt feltehetően más folyamatok indukálták. Már önmagában a Flag-KEPI-vel történő transzfekció is foszfo-pRb emelkedést eredményezett, ami még szembetűnőbbé vált, ha a transzfektált sejteket CLA-val kezeltük (26. B ábra jobb oldal).

PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata HaCaT keratinocita sejtekben

Túlzott ultraibolya (UV) sugárzások következményeként gyakran alakulnak ki a bőrt érintő daganatos megbetegedések, amelyekben a Ser/Thr protein foszfatázok, így a PP1 által szabályozott jelátviteli útvonalak is részt vehetnek (Heck és mtsai., 2004; Cao és Wan, 2009). Habár He és munkatársai már korábban vizsgálták az UVA hatásait HaCaT keratinocita sejteken (He és mtsai., 2004), azonban a protein foszfatázok szerepe még nem tisztázott, ezért munkám során vizsgáltam a PP1 lehetséges funkcióját az UVA sugárzások által kiváltott megbetegedésekben.

PP1 katalitikus alegység izoformák azonosítása HaCaT sejtek frakcióiban

A különböző PP1c izoformák sejten belüli lokalizációját a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységek szabályozzák (Cohen, 2002), ami eltérő funkciókat eredményezhet. Első feladatként a PP1c izoformáinak és a PP2A sejten belüli expresszióját és lokalizációját vizsgáltuk. HaCaT sejtekből elválasztottuk a szubcelluláris frakciókat és a sejtmagi, citoszolikus és citoskeletális frakciókat Western blotlalt analizáltuk anti-PP1c δ , anti-PP1c α/γ és anti-PP2A antitesteket alkalmazva. A PP1c δ izoformát mindhárom frakcióban detektáltuk, míg a PP1c α/γ izoformákat elsősorban a citoszolban és a citoskeletonban tudtuk kimutatni (27. A ábra első és második sáv), de kisebb mennyiségben a sejtmagi frakcióban is detektáltuk. A PP2A a PP1c izoformához hasonlóan főleg a citoskeletonban és citoszolban volt kimutatható (27. A ábra harmadik sáv). A frakciók tisztaságának ellenőrzésére anti-hisztin (27. A ábra negyedik sáv), anti-tubulin (27. A ábra ötödik sáv) és anti-GAPDH (27. A ábra hatodik sáv) antitestet alkalmaztunk.



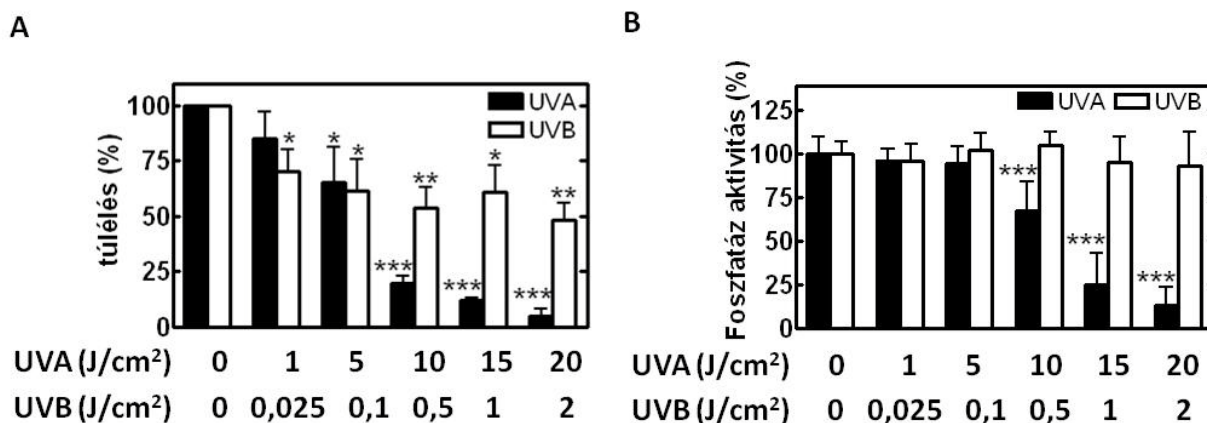
27. ábra PP1c izoformák lokalizációja HaCaT sejtekben és a HaCaT sejtfrakciók foszfatáz aktivitása. A HaCaT sejteket, 90%-os konfluencia elérése után az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően frakcionáltuk. A: A különböző HaCaT frakciókat (sejtmag, citoszkeleton, citoszol) Western blottal analizáltuk anti-PP1cδ, anti-PP1α/γ és anti-PP2A antitesteket használva. A frakciók tisztaságának ellenőrzésére anti-hiszton (sejtmag), anti-tubulin (citoszkeleton) és anti GAPDH (citoszol) antitesteket alkalmaztunk. B: HaCaT sejtfrakciók foszfatáz aktivitásának méréséhez ³²P-MLC20 szubsztrátot használtunk. A méréseket effektor távollétében (fekete oszlopok) és 5 nM OA jelenlétében (fehér oszlopok) végeztük. A foszfatáz aktivitás értékeit nmol ³²P_i/perc egységben adtuk meg. Szignifikáns változások: **p<0,01, ***p<0,001, ##p<0,01, ###p<0,001, n.s. nem szignifikáns. C: Fixálás után a sejteket anti-PP1α/γ (a, piros), anti-PP1cδ (d, zöld) és anti-PP2A (g, piros) antitestekkel jelöltük. A sejtmag festésére DAPI festéket (b, e, h kék) használtunk. Az egyesített képeken (c, f, i) az egyes PP1c izoformák és PP2A lokalizációja látható. Méretvonal=20 μm

A PP1 és PP2A által is defoszforilálható ³²P-MLC20 szubsztrát segítségével határoztuk meg az egyes frakciók protein foszfatáz aktivitását (27. B ábra fekete oszlopok). A PP1 és PP2A foszfatáz aktivitások megoszlásának vizsgálatához a frakciók aktivitását 5 nM okadánsav

jelenlétében (fehér oszlopok) is megmértük, ami ebben a koncentrációban a PP2A gátlószere (Favre és mtsai., 1997). A sejtmag és citoszol frakciókban a PP1 és PP2A aktivitás megoszlása kb. 50-50 %, míg a citoszkeletonban a PP1 aktivitás domináns. Az izoformák lokalizációját immunfluoreszcenciás módszerrel is vizsgáltuk (27. *C ábra*). A Western blot analízis során kapott eredményekkel összhangban a PP1c izoforma elsősorban a citoszolban volt kimutatható (*a, c, piros*), a PP1c δ -t a citoszolon kívül a sejtmagban is detektálni tudtuk (*d, f, zöld*), és a PP2A szintén kimutatható volt a citoszolon kívül a sejtmagban is (*g, i, piros*).

UV sugárzás dóziszfüggő hatása a HaCaT sejtek életképességére és foszfatáz aktivitására

Ahhoz, hogy a PP1 szerepét vizsgáljuk az UV sugárzások által okozott változásokban, szükséges a minimális, de még kellő mértékben hatásos UV dózis megállapítása. Ehhez, különböző UVA és UVB besugárzások után mértük a sejtek életképességét a besugárzást követő 24. órában MTT módszerrel (28. *A ábra*). A foszfatáz aktivitást a besugárzást követően azonnal mértük (28. *B ábra*). Mindkét esetben a HaCaT sejteket 1, 5, 10, 15, 20 J/cm² UVA (fekete oszlopok) és 0,025, 0,1 0,5, 1, 2 J/cm² UVB (fehér oszlopok) dózissal sugároztuk be. MTT módszerrel a besugárzást követően 24 óra múlva vizsgáltuk a sejtek túlélését, míg foszfatáz aktivitás során a minimálisra hígított lizátumok aktivitását a besugárzást követően azonnal megmértük. Az sejtek életképessége UV dózis-függő módon csökkent, azonban a foszfatáz aktivitás esetében csak UVA sugárzást követően figyeltük meg dózis-függést. Mivel UVB sugárzás nem csökkentette szignifikánsan a protein foszfatáz aktivitást, e sugárzás hatását a továbbiakban nem vizsgáltuk (átlagos napi dózis 2-4 J/cm²). Minimális, de még hatásos UV dózissal a 10 J/cm² UVA besugárzást választottuk (átlagos napi UVA dózis (10-18 J/cm²) (Staberg és mtsai., 1983) és további kísérleteinkben ezt alkalmaztuk.

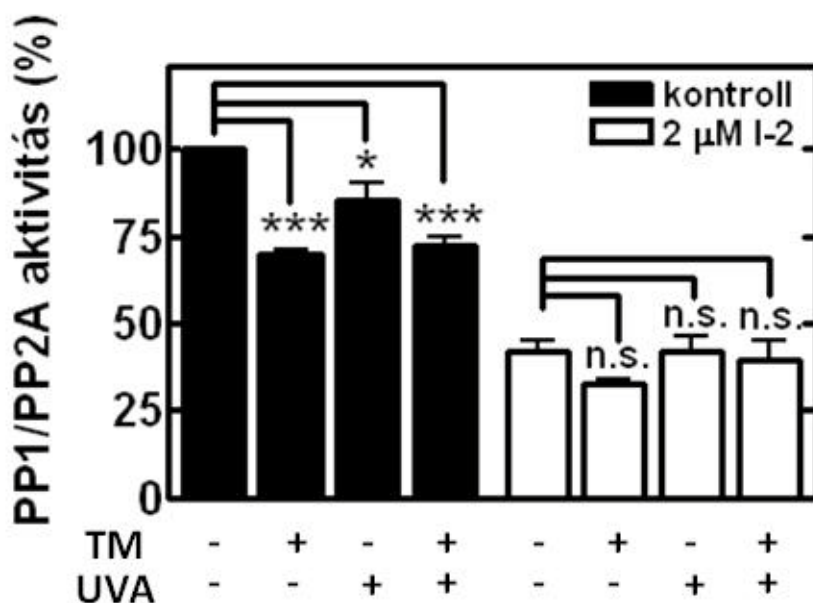


28. ábra HaCaT sejtek életképességének és foszfatáz aktivitásának változása különböző UV sugárzások és dózisok hatására.

A HaCaT sejteket 96-lyukú platen növesztettük 90%-os konfluencia eléréséig, majd a sejteket 16 órán át éhesztettük szérumbanmentes médiumban. A: HaCaT sejteket különböző UVA (1-20 J/cm²) (fekete oszlopok) és UVB (0,025-2 J/cm²) (fehér oszlopok) dózissal sugároztuk be. A sejtek életképességét MTT módszerrel határoztuk meg a besugárzást követő 24. órában. Az UVA-val és UVB-vel besugárzott sejtek túlélését a kezeletlen kontroll sejtekhez hasonlítottuk, amit 100 %-nak tekintettünk. Szignifikáns változások: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=5. B: HaCaT sejteket különböző UVA (1-20 J/cm²) (fekete oszlopok) és UVB (0,025-2 J/cm²) (fehér oszlopok) dózissal besugároztunk, és a foszfatáz aktivitást a sejtek lizátumából ³²P-MLC20 szubsztráttal határoztuk meg közvetlenül az UV kezelést követően. A kezeletlen kontroll sejtek aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változás:***p<0,001, n=3.

Protein foszfatáz inhibitor toxinok szelektivitásának ellenőrzése HaCaT sejtekben

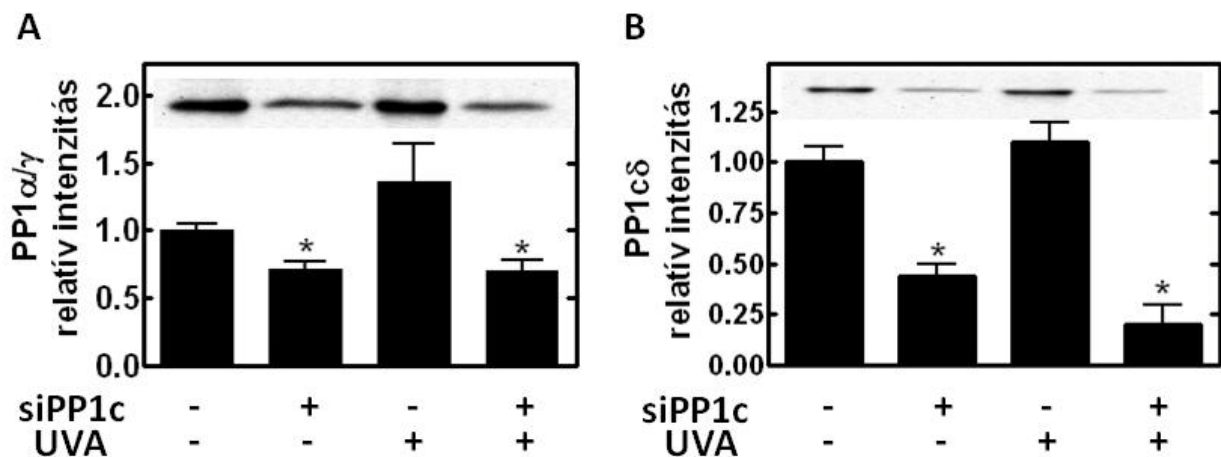
Az inhibitor toxin szelektivitásának ellenőrzését nemcsak THP-1 sejteken (16. ábra), de HaCaT sejteken is elvégeztük. 1µM TM (1 óra) és/vagy 10 J/cm² kezeléseket követően a sejteket azonnal lizáltuk, és ³²P-MLC20 szubsztrát alkalmazásával mértük a PP1 és PP2A aktivitását. A kezeletlen kontroll sejtek esetében a µM inhibitor I-2 jelenlétében mért aktivitás csökkenés (~60 %) a PP1 aktivitását jellemzi, míg a fenmaradó ~40 % a PP2A-nak tulajdonítható. A TM kezelést (1 óra) követően ~30 %-os, az UVA kezelést követően ~20 %-os és a kombinált kezelést µM TM és 10 J/cm² UVA) követően ~28 %-os aktivitás csökkenést tapasztaltunk. I-2 jelenlétében a különböző kezeléseket nem okoztak szignifikáns változást a kezeletlen kontroll sejtekhez képest, így megállapítható, hogy nemcsak a TM, hanem az UVA kezelés hatására is szelektív PP1 gátlás történik a HaCaT sejtekben (29. ábra).



29. ábra TM kezelés és UVA besugárzás protein foszfatáz specificitásának ellenőrzése. 90%-os konfluencia elérése után a HaCaT sejteket 16 órán át szérumehezgettük, majd a sejteket 1 μM TM-nel (1 óra), 10 J/cm² UVA sugárzással, illetve ezek kombinációjával kezeltük. A sejteket az UVA besugárzást követően azonnal feltártuk, és 1 μM ³²P-MLC20 szubsztrátot felhasználva mértük a lizátumok foszfatáz aktivitását 2 μM I-2 nélkül (fekete oszlop), illetve annak jelenlétében (fehér oszlop). A kezeletlen HaCaT sejtek foszfatáz aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: *p<0.05, ***p<0.001, n.s. nem szignifikáns, n=5.

PP1c csendesítés és UVA besugárzás hatása a PP1c izoformák expressziójára

A PP1 enzimnek a keratinociták homeosztázisában, ill. az UVA sugárzások által okozott patológiás folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára a PP1c izoformákat csendesítettük HaCaT sejtekben. 48 órával a csendesítést követően a sejteket 10 J/cm² UVA-val besugároztuk, a sejteket lizáltuk, a csendesítés hatékonyságát Western blot analízissel ellenőriztük (30. ábra), illetve denzitometrálassal meghatároztuk a PP1c izoformák relatív expresszióját (PP1cα/γ ~0,6 PP1cδ ~0,4). UVA kezelés után a PP1c izoformák expressziója nem változott szignifikánsan a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva, ami bizonyítja, hogy a 29. B ábrán tapasztalt protein foszfatáz aktivitás csökkenés nem a PP1c izoformák degradációja, vagy expressziójának csökkenése miatt következett be. A két kezelést (PP1c csendesítés és UVA besugárzás) követően további, mérsékelt fehérjeszint csökkenést csak a PP1cδ izoforma esetén detektáltunk.

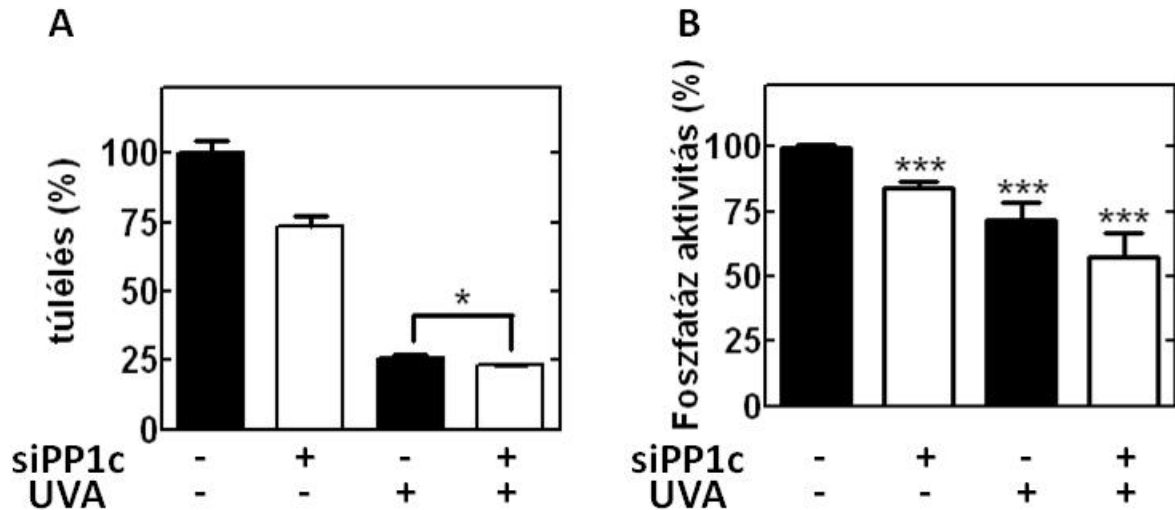


30. ábra PP1c izoformák expressziójának ellenőrzése PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően HaCaT sejtekben.

panPP1 csendesítést (2. és 4. oszlop) és 16 óra széruméheztetést követően a sejteket 10 J/cm² UVA dózissal besugároztuk (3. és 4. oszlop). 24 óra múlva a sejtek lizátumát Western bloton anti-PP1α/γ (A) és anti-PP1cδ (B) antitestekkel analizáltuk. A PP1c/tubulin denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változás: *p<0,05, n=5

PP1c csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek életképessége és foszfatáz aktivitása

Vizgáltuk, hogy a PP1c csendesítés, illetve annak UVA kezeléssel történő kombinálása hogyan befolyásolja a HaCaT sejtek túlélését és foszfatáz aktivitását. Ennek vizsgálatára MTT életképesség- (31. A ábra) és foszfatáz aktivitás méréseket (31. B ábra) végeztünk. Csendesítést és UVA besugárzást követően a foszfatáz aktivitást azonnal, míg a sejtek életképességét 24 órás inkubáció után mértük. A PP1c csendesítés a HaCaT sejtek életképességét kb. 25 %-kal, míg az UVA besugárzás kb. 80 %-kal csökkentette. Az UVA besugárzás után tapasztalt életképesség csökkenés összhangban van az UV dózis-függés vizsgálatánál tapasztaltakkal (29. A ábra). Ha a két kezelést (PP1c csendesítés és UVA besugárzás) együtt alkalmaztuk, akkor további, kismértékű életképesség csökkenést detektáltunk az UVA besugárzáshoz képest (31. A ábra). A PP1c csendesítés (kb. 20 %-kal) és UVA besugárzás (kb. 30 %-kal) külön-külön is csökkentette a foszfatáz aktivitást, azonban a két kezelés kombinálása után a hatások nem adódtak össze (31. B ábra).

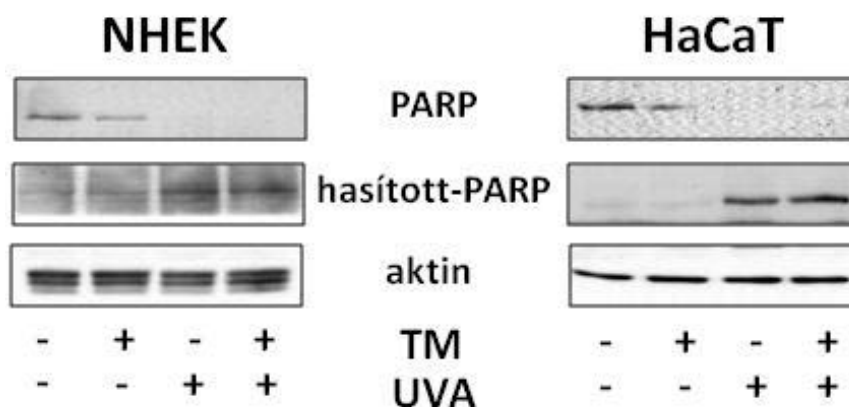


31. ábra PP1 csendesítés és UVA besugárzás hatása a HaCaT sejtek túlélésére és foszfátáz aktivitására.

A: A 90-100% konfluenciát elért PP1c csendesített és UVA (10 J/cm^2) besugárzott sejtek életképességét a besugárzást követően 24 órával MTT módszerrel határoztuk meg. A kezeletlen sejtek életképességét tekintettük 100 %-nak, $n=4$. B: PP1c csendesített és UVA (10 J/cm^2) besugárzott sejtek foszfátáz aktivitását az UVA besugárzást követően azonnal meghatároztuk ^{32}P -MLC20 szubsztrátot felhasználva. A kezeletlen sejtek foszfátáz aktivitását tekintettük 100 %-nak. Szignifikáns változások: * $p<0,05$, *** $p<0,001$, $n=3$.

NHEK és HaCaT sejtek apoptózisának vizsgálata

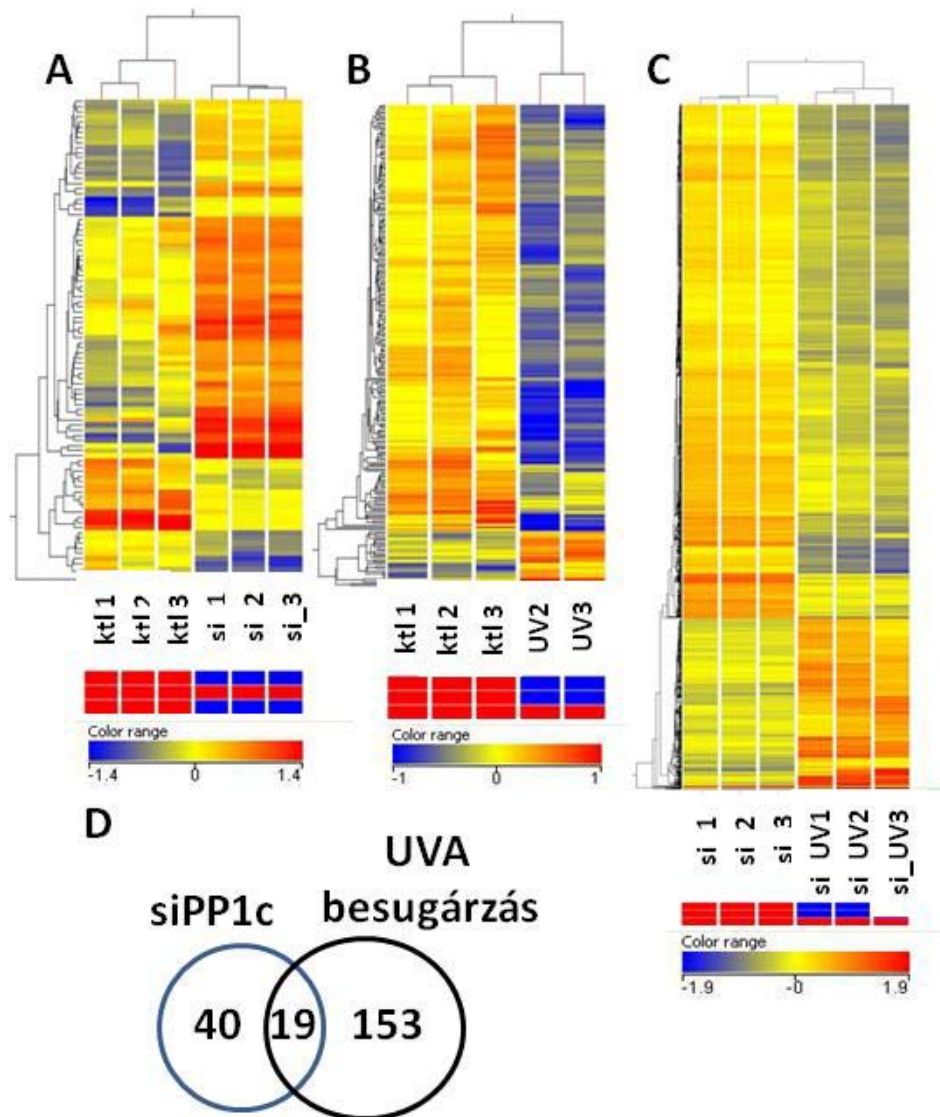
A túlélés vizsgálatokor felmerülő kérdés tisztázására, miszerint a kezelt sejtek életképességének csökkenése apoptózis vagy nekrozis eredményeként következik-e be, HaCaT és primer humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteken vizsgáltuk a PARP és a hasított-PARP fehérjék mennyiségét. Mivel a kaszpáz-3 képes hasítani a PARP fehérjét, így a PARP fehérje feldarabolódását, illetve a hasított-PARP fehérje megjelenését az apoptózis egyik markereként tekintik (Hur és mtsai., 2008). HaCaT és NHEK sejteket μM TM -el kezeltük és/vagy 10 J/cm^2 UVA-val besugároztuk, és Western blot analízissel vizsgáltuk az említett fehérjék hasítását, illetve megjelenését. Mindkét sejt esetében, a TM kezelés a teljes-PARP részleges degradációját eredményezte, míg az UVA kezelés önmagában, illetve TM kezeléssel kombinálva a teljes-PARP eltűnéséhez, ezzel párhuzamosan a hasított-PARP megjelenéséhez vezetett (32. ábra).



32. ábra TM kezelés és UVA besugárzás hatására bekövetkező sejthalál vizsgálata. Az NHEK és HaCaT sejteket 90% -os konfluencia elérése után 16 órán át széruméheztettük, majd TM-nel (1 μ M, 1óra) kezeltük és/vagy UVA-val (10 J/cm²) besugároztuk. A besugárzást követő 24. órában NHEK és HaCaT sejtek lizátumát Western bloton anti-PARP és anti-hasított-PARP antitestekkel vizsgáltuk. Belső kontrollnak aktint használtunk. n=3.

PP1 csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek microarray analízise és génontológiai elemzése

A változások gén szintű hátterének, illetve a PP1 enzimek UV sugárzás során kifejtett szerepének vizsgálatához 48 órával a PP1c csendesítést követően a HaCaT sejteket UVA-val besugároztuk, majd 24 óra múlva RNS-t izoláltunk a mintákból. A csendesítés sikerességét Western blot analízissel ellenőriztük. A PP1c csendesítés (33. A ábra), az UVA sugárzás (10 J/cm²) (33. B ábra), valamint a két hatás együttes vizsgálatát (33. C ábra) végeztük el microarray analízissel. Az up- (piros) és downregulálódott (kék) gének változásait Affimetrix programmal elemeztük és értékeltük 1,5x detektálási limitet használva. Az UV-kezelés során 153 gén, míg a PP1c csendesítés hatására 40 gén expressziója változott. A Venn- diagramm alapján (33. D ábra) 19 gént azonosítottunk, amelyeknek szerepe lehet a PP1 enzimesalád és az UVA által indukált változásokban (33. ábra). Az UVA sugárzás a gének több mint 80 %-ra gátló hatást fejtett ki, míg a PP1c-csendesítés ezzel ellentétben a gének csaknem háromnegyedének fokozott expresszióját okozta.



33. ábra PP1c csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek microarray analízise. Kezeletlen kontroll (ktl), PP1c csendesítést (si) (A), UVA besugárzást (UV) (B) és kombinált kezelést (PP1c csendesítés, UVA besugárzás) (C) követően a HaCaT sejtekből kinyert RNS elemzése során a legalább 1,5-szeres növekedést mutató géneket piros színnel, míg a legalább 1,5-szeres csökkenést mutató géneket kék színnel jelöltük. A Venn-diagrammban (D) szereplő számok az egyes kezelések hatására megváltozott gének számát jelölik.

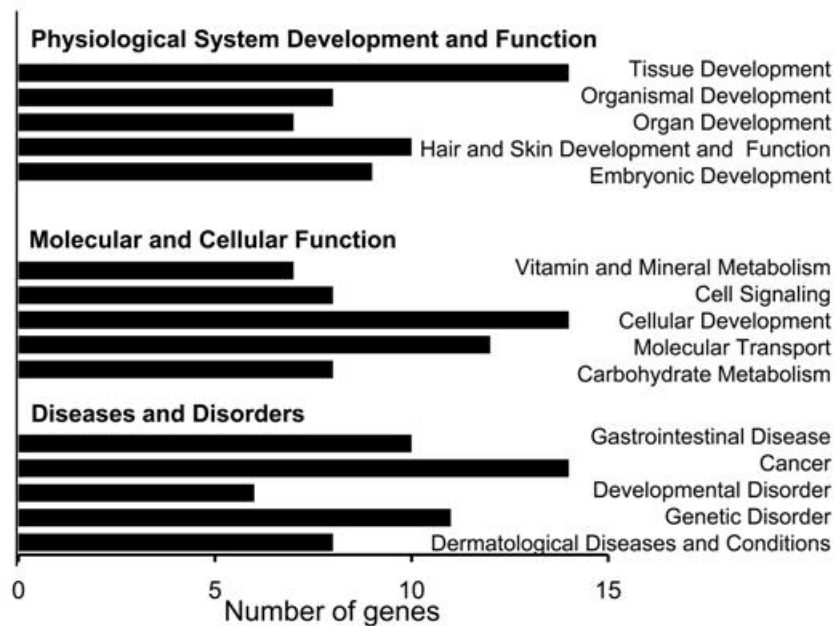
A 34. ábrán, a Venn-diagramm alapján kapott 19 gén vizsgálatából kiderül, hogy a PP1 csendesítés hatására valamennyi PP1c izoforma génexpressziója csökkent, ami alátámasztja a fehérjeszinten Western blot analízissel kimutatott PP1c-szint csökkenését (30. ábra). A keratin 1 és 10 intermedier filamentumok expressziója növekedett, ami a PP1 enzimsalád tumorképződésben és citoszkeleton integritásának fenntartásában betöltött szerepére utalhat. Az S100A8 kalcium-kötő fehérje egyben melanóma marker is, amely a sejtciklusban és sejt differenciációban játszik szerepet, valamint a keratin 1/10 fehérjéjével

együtt melanóma-asszociált fehérjeként is leírták (Karantza, 2011). A hiszton 1b expressziójának csökkenése szintén jellemző egyes daganat típusokra.

Gene symbol	Gene description	FCAbsolute	p-value	Regulation
SPRR1A	small proline-rich protein 1A	1,6583863	0,028035454	up
SYT14	synaptotagmin XIV	1,8127145	0,018231576	down
S100A8	S100 calcium binding protein A8	2,793098	0,008243864	up
PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	2,4211235	0,002062404	down
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	2,4115264	0,015460181	down
PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	2,8308427	0,007980243	down
KRT1	keratin 1	1,8237817	0,032815848	up
KRT10	keratin 10	2,0168843	0,033456925	up
CSTA	cystatin A (stefin A)	1,7604542	0,024688251	up
SLC10A5	solute carrier family 10	1,5896987	0,030389255	up
CALB1	calbindin 1, 28kDa	2,1373563	0,030286945	up
AKR1B10	aldo-keto reductase family 1	1,6602112	8,43E-04	up
HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk	1,592079	0,030398045	up
HIST1H1B	histone cluster 1, H1b	1,5847706	0,04305782	down
FST	follistatin	1,5107898	0,040943876	down
STC2	stanniocalcin 2	1,5897064	0,004003943	up
RNU4-1	RNA, U4 small nuclear 1	2,347584	0,020652581	up
HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	2,4448695	0,03972742	up
RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	2,5820403	0,04596669	up

34. ábra Venn-diagramm alapján kapott gének listája

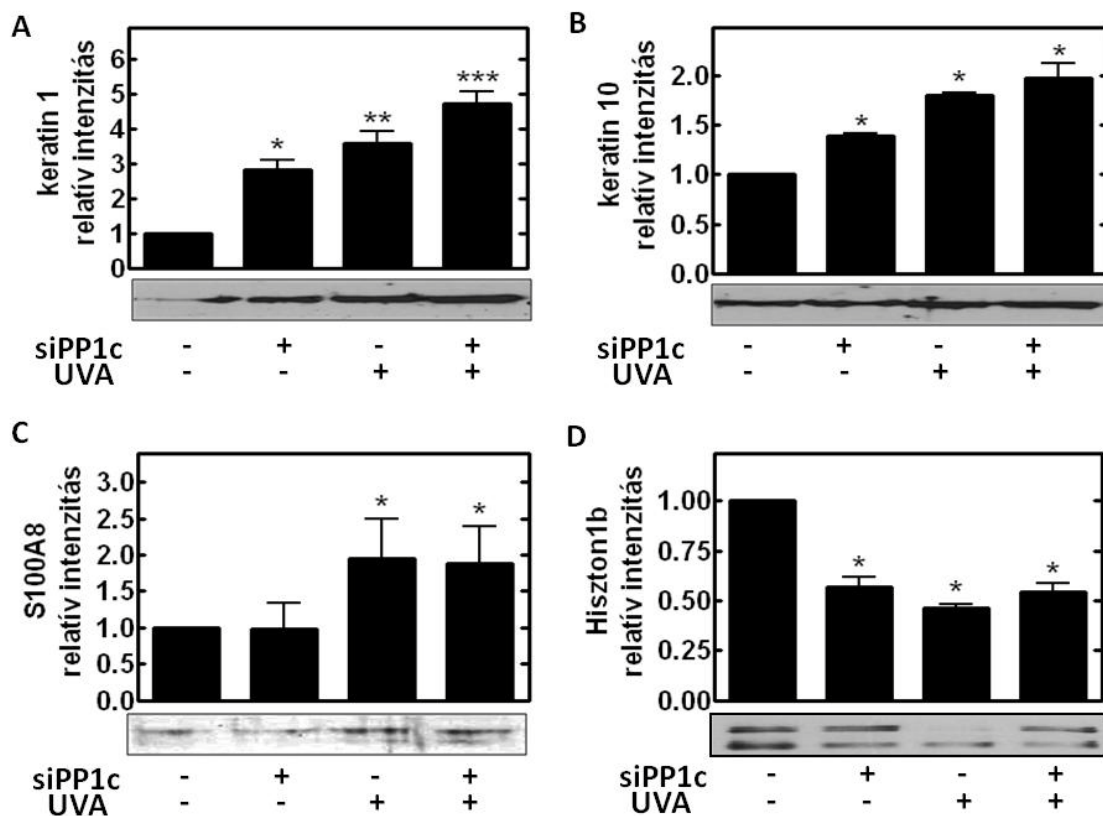
A génexpressziós vizsgálat adatainak génontológiai elemzésével azon molekuláris és élettani folyamatokat, valamint megbetegedéseket és kórképeket kívántuk megjelölni, amelyekben a PP1 enzimes család szerepet játszhat az UVA sugárzás során kialakult kóros elváltozásokban. A legtöbb érintett gén a szövetfejlődésben, szőr- és bőrfejlődésben játszik szerepet. A gének nagy része a jelátviteli folyamatokban és molekuláris transzportban valamint a sejtek fejlődésében is érintett. A lehetséges betegségecsoportok közül kiemelendő a rákos megbetegedésekkel, a genetikai rendellenességekkel valamint a bőrelváltozásokkal és bőrbetegségekkel kapcsolatban lévő gének magas száma (35. ábra).



35. ábra Génontológiai elemzés

Keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziós változása PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően HaCaT sejtekben

A microarray analízis és génontológiai elemzések során kapott változások fehérje szinten történő vizsgálatához a bőr daganatos megbetegedéseiben markerként szolgáló fehérjék (keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b) expresszióját vizsgáltuk Western blot analízissel. A csendesítést követő 48. órában a sejtek egy csoportját 10 J/cm^2 UVA-val besugároztuk, majd 24 óra inkubáció után a kezeletlen kontroll, a PP1c csendesített és/vagy UVA kezelt sejteket lizáltuk. A mintákat anti-keratin 1, anti-keratin 10, anti-S100A8 és anti-hiszton 1b antitestekkel inkubáltuk. A keratin 1 (36. A ábra) és keratin 10 (36. B ábra) fehérjék mennyisége PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően szignifikánsan megnőtt, és további, de nem összeadódó emelkedést tapasztaltunk a két kezelés (PP1c csendesítés és UVA besugárzás) kombinálását követően. S100A8 fehérje (36. C ábra) esetében a PP1c csendesítés önmagában nem okozott expressziós emelkedést, azonban az UVA kezelés és a kombinált kezelés megnövelte a fehérje mennyiségét. A hiszton 1b fehérje (36. D ábra) expressziója az egyes kezelések és a kombinált kezelés során is csökkent. Ezek a változások a microarray analízissel kapott adatokkal (33. ábra) összhangban állnak, és a túl- és alulműködés nemcsak gén, de a fehérjék mennyiségi szintjén is kifejeződött.



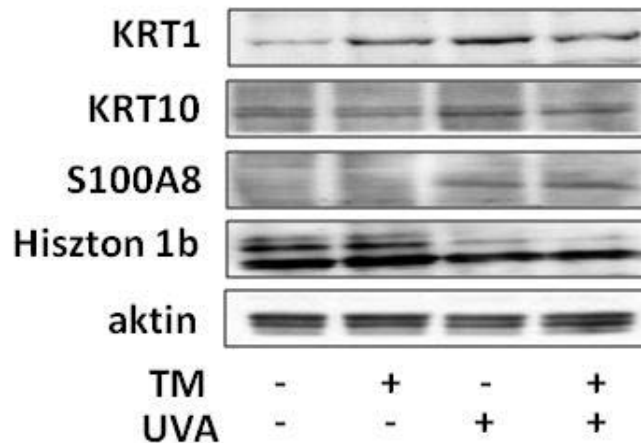
36. ábra PP1c csendesítés és UVA besugárzás hatása a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára HaCaT sejtekben.

Kontroll kezeletlen, PP1c csendesített, UVA (10 J/cm^2) besugárzott valamint PP1c csendesített és UVA besugárzott HaCaT sejtek lizátumát vizsgáltuk Western blot analízissel. A fehérjék expressziós változását anti-keratin 1 (A), anti-keratin 10 (B), anti-S100A8 (C) és anti-hiszton 1b (D) antitestekkel határoztuk meg. A fehérje (keratin 1, keratin 10, S100A8, hiszton 1b)/tubulin denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n=3$.

A PP1c szabályozó szerepének vizsgálata keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára NHEK sejtekben

Mivel az NHEK sejtek nehezen transzfektálhatóak, azonban a bőrrel foglalkozó kutatások legjobb medelljeként szolgálnak, így PP1c csendesítés helyett a PP1 gátlását TM toxin alkalmazásával érték el. $1 \mu\text{M}$ TM (1 óra) és/vagy 10 J/cm^2 kezelést követő 24. órában Western blot analízissel vizsgáltuk hogyan változik a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék mennyisége. Akárcsak a PP1c csendesített HaCaT keratinocita sejtekben, itt is azt tapasztaltuk, hogy a TM-nel történő PP1c gátolt, illetve UVA-val besugárzott sejtekben megnövekedett a keratin 1 és keratin 10 expressziója (37. ábra 1. és 2. sáv). A TM szelektivitásának vizsgálatából (28. ábra) kitűnik, hogy a TM csak részleges PP1 gátlást eredményezett, így az siPP1c HaCaT sejtekhez képest kisebb mértékű fehérje mennyiségbeli

emelkedést tapasztaltunk. S100A8 fehérje esetében a TM kezelés önmagában nem, azonban az UVA kezelés önmagában és a kombinált kezelés (TM, UVA) is megnövelte a fehérje mennyiségét (37. ábra 3. sáv). Az egyes kezeléseket követően csökkent hiszton 1b fehérje mennyiséget detektáltunk (37. ábra 4. sáv). Ezek az eredmények az siPP1c csendesített HaCaT sejteken kapott eredményeinkkel (36. ábra) összhangban állnak.



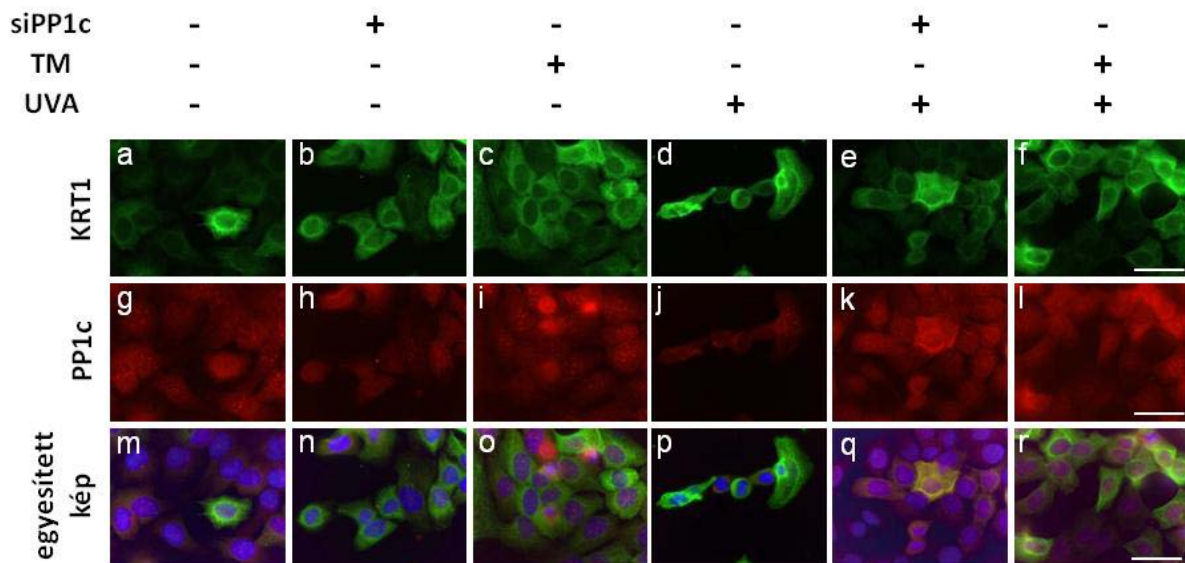
37. ábra TM kezelés és UVA besugárzás hatása a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára NHEK sejtekben.

Az NHEK sejteket 90% -os konfluencia elérése után 16 órán át széruméheztettük, majd a kontroll kezeletlen, TM kezelt (1 μ M, 1 óra) és/vagy UVA (10 J/cm²) besugárzott sejtek lizátumát vizsgáltuk Western blot analízissel. A fehérjék expressziós változását anti-keratin 1, anti-keratin 10, anti-S100A8 és anti-hiszton 1b antitestekkel határoztuk meg.

Keratin 1 lokalizációs változása HaCaT sejteken PP1c csendesítést és UVA besugárzást követően

Mivel a keratin molekulák a keratinocita sejtek barrier funkciójának kialakításában és citoszkeletális vázának felépítésében vesznek részt, ami daganatos megbetegedések során megváltozik, ezért vizsgáltuk, hogy az egyes kezeléseket milyen szerkezeti változásokat eredményeznek. TM kezelést, PP1c csendesítést és UVA besugárzást követő 24. órában a sejteket fedőlemezekre fixáltuk és a mintákat keratin 1-re (KRT1) (38. ábra, a-f, zöld) és PP1-re (38. ábra, g-l, piros) specifikus antitesttel jelöltük. Az immunreakció detektálására fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk. A kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva (38. ábra a, g) a csendesítést, TM kezelést, UVA besugárzást és a kombinált kezeléseket követően megnövekedett keratin 1 fehérje mennyiséget detektáltunk, ami perinukleáris elrendeződést mutatott (38. ábra, b-f, n-r). Májsejtekben már korábban kimutatták, hogy mikrocisztiin-LR (PP1 és PP2A gátlószere) kezelés hatására a keratin intermedier filamentumok átrendeződnek (Toivola és mtsai., 1997), így nem meglepő, hogy

PP1 csendesítés, TM kezelés és/vagy UVA besugárzás következtében lecsökkent foszfatáz aktivitás hatására a kezeletlen kontroll HaCaT sejtekben a diffúz eloszlású keratin 1 lokalizációjának megváltozását tapasztaltuk.

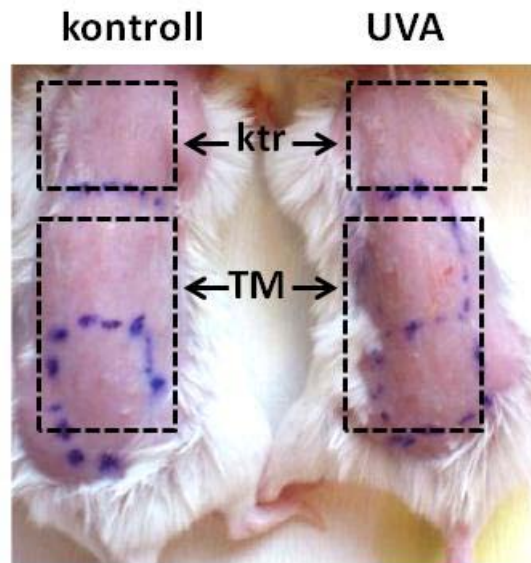


38. ábra PP1c csendesítés és UVA besugárzás hatása a keratin 1 fehérje lokalizációjára. HaCaT sejteket ($\sim 10^6$ /ml) szuszpenzióban történő PP1c csendesítés után, illetve a kezeletlen sejteket steril üveg fedőlemezekben növesztettük 10 % FBS-t tartalmazó médiumban, és a kezeléseket megelőzően 16 óráig szérumentes médiumban tartottuk. A kontroll, az 1 μ M TM-el kezelt, a PP1c csendesített, az UVA-val (10 J/cm²) besugárzott, az 1 μ M TM és UVA-val (10 J/cm²) kezelt, a csendesített és UVA-val (10 J/cm²) besugárzott sejteket a fedőlemezekre fixáltuk, és anti-keratin 1 (KRT1) (a-f zöld), anti-PP1 (g-l piros) antitesttel jelöltük. A sejtmag festésére DAPI festéket használtunk. Az egyesített képeken (n-r) a kontrollhoz (m) viszonyított megnövekedett keratin 1 expresszió mellett perinukleáris tömörülés detektálható. Méretvonal=20 μ m

PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata Balb/c egereken

Kísérleteink eredményeit *in vivo* rendszerben is szeretnénk volna megerősíteni, amelyekhez Balb/c (Charles River) törzsből származó hat hetes fehér egereket használtunk. Mivel nem rendelkezünk PP1c knock out egerekkel, ezért a PP1c gátlását PP1-re specifikus koncentrációban (1 μ M), hidrofíln anionos ~~am~~ben oldott tautomycin inhibitor toxinnal végeztük. Az egerek hátáról a szőrt kereskedelmi forgalomban kapható (Veet) szőrtelenítő krémmel távolítottuk el, és a kezelt bőrfelületet megjelöltük (39. ábra). A kezeléseket a szőrtelenítés után 24 órával kezdtük meg. Az egerek bőrét 1 órával az UVA besugárzás előtt kezeltük a PP1 inhibitor toxint (TM) tartalmazó krémmel. Az UVA besugárzás alkalmanként 30 percig tartott, öt alkalommal, ami összesen 531 J/cm² jelentett. A kontroll és UVA

besugárzott egerek csoportja is 8-8 egyedből állt. Cervikális diszlokációt követően mintát vettünk, amit hisztológiai és Western blot analízissel vizsgáltunk.

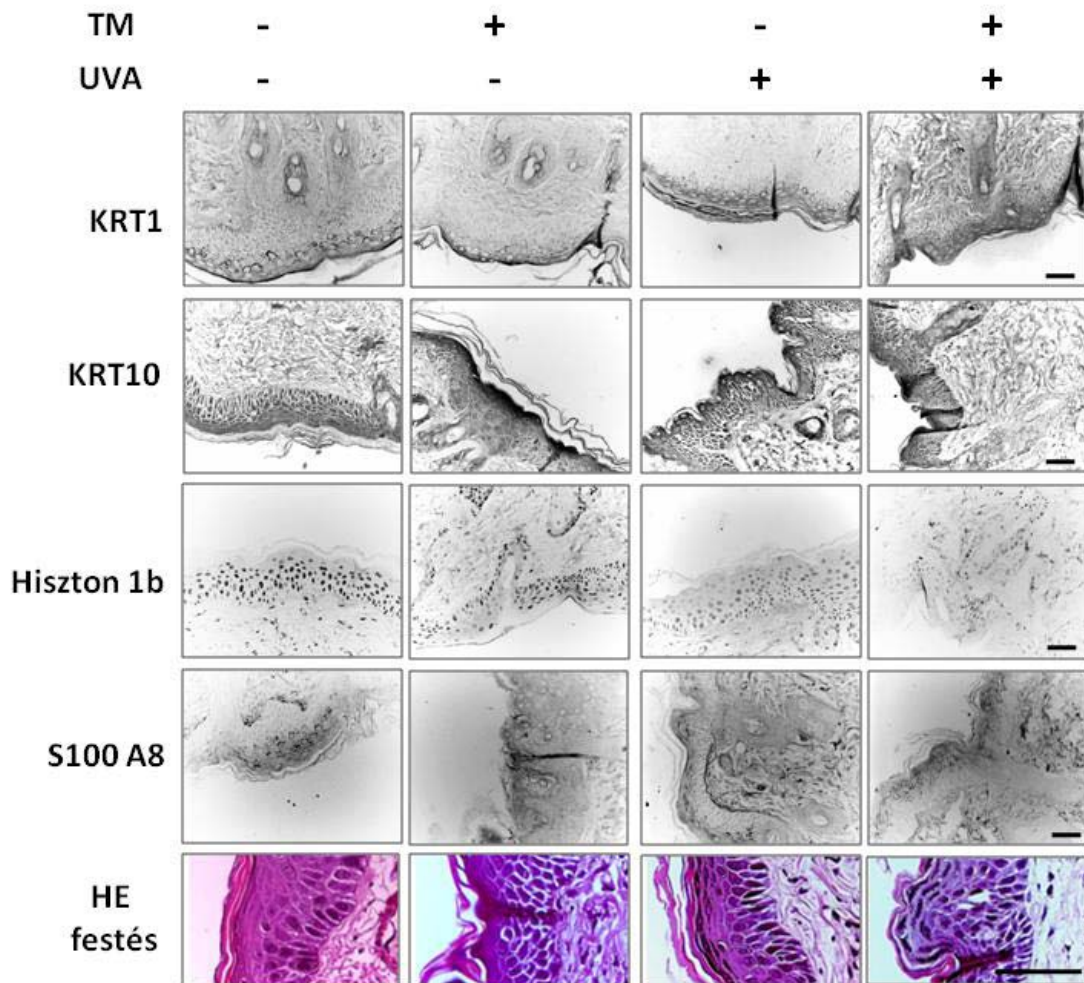


39. ábra Balb/c egerek

A kontroll és UVA besugárzott (összesen 531 J/cm^2) (8-8 egér) Balb/c egerek hátáról a szőrt eltávolítottuk, és a kezelt területeket (kezeletlen kontroll, TM kezelt) megjelöltük.

PP1 gátlás és UVA hatásának szövettani vizsgálata

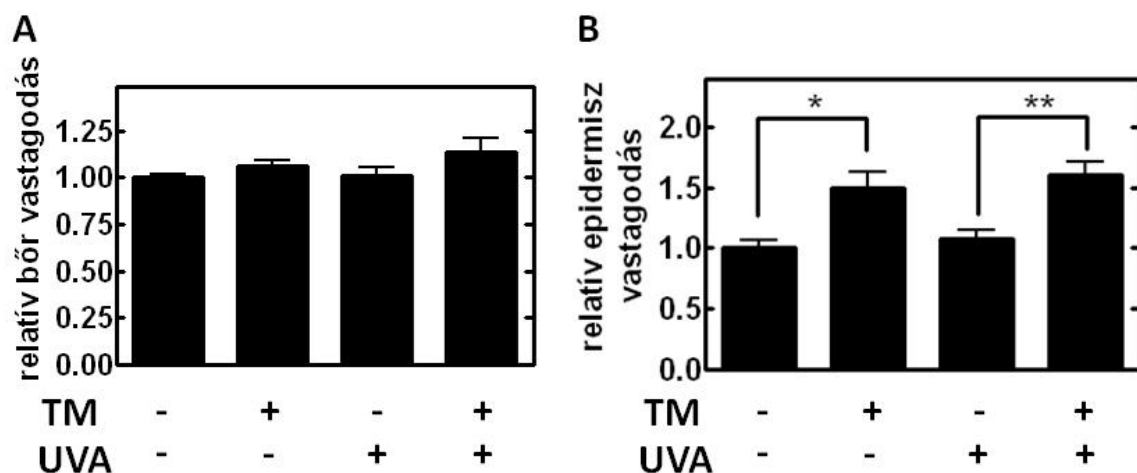
A kezeléseket (PP1 gátlás TM kezeléssel, UVA besugárzás) követően, a biopsziával vett minták egy részét szövettani analízisnek vetettük alá. A metszeteket fedőlemezekre helyeztük, xilollal deparaffináltuk, felszálló alkoholsorral dehidráltuk, amit hematoxin és eosin (H&E) festés követett (40. ábra, alsó rész). A metszetek másik felét anti-keratin 1, anti-keratin 10, anti-S100A8 és anti-hiszton 1b elsődleges antitestekkel inkubáltuk, majd másodlagos antitesttel történő inkubáció után az immunreakciók eredményét 3,3'-diaminobenzidin-nikkel (DAB-Ni) felhasználásával tettük láthatóvá. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során, a Western blot analízissel kapott eredményekkel összhangban megnövekedett keratin 1, keratin 10 és S100A8, valamint csökkent hiszton 1b fehérje expressziót detektáltunk TM és/vagy UVA kezeléseket követően (40. ábra).



40. ábra PP1 gátlás és UVA hatásának szövettani vizsgálata egérbőrön.

Kezeletlen, TM kezelt és/vagy UVA besugárzott (összesen 531 J/cm^2) Balb/c egérbőr mintákból készült metszeteken vizsgáltuk DAB-Ni immunhisztokémiai módszert alkalmazva a keratin 1, keratin 10 (KRT1/10), hiszton 1b és S100A8 fehérjék mennyiségét. Az ábra alsó részén a metszetek H&E festése látható. Méretvonal=20 μm , n=8.

Az egyes kezelések után a teljes bőr vastagsága nem változott szignifikánsan a kezeletlen kontroll bőrhöz képest (41. A ábra), azonban PP1 gátlást követően az epidermisz vastagsága több mint másfélszeresére nőtt (41. B ábra).

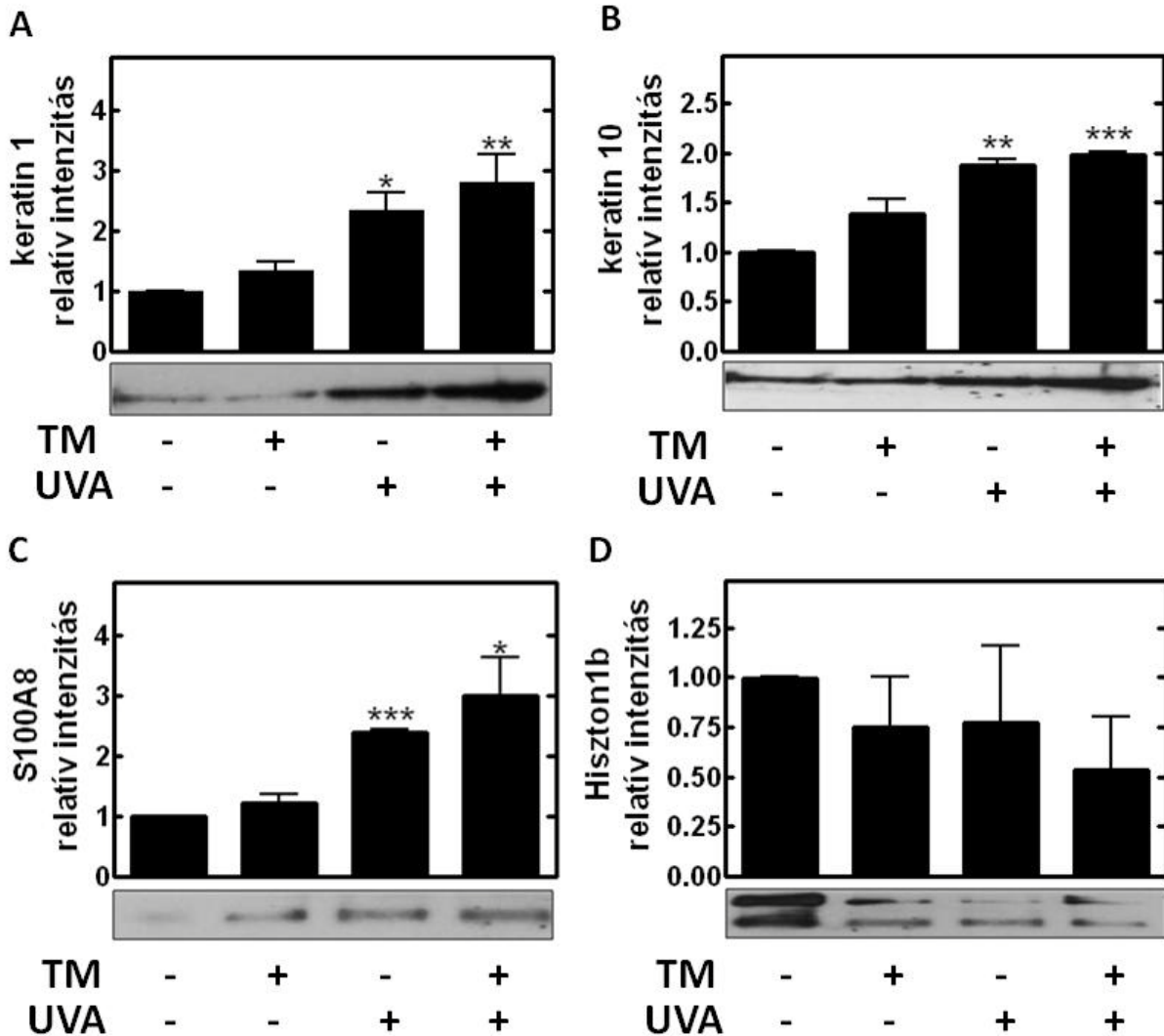


41. ábra PP1 gátlás és UVA hatása egérbőrön.

A H&E-nal festett szövettani mintákból mértük a kezeltlen kontroll bőrhöz viszonyítva a teljes bőr (A) és epidermisz (B) vastagodást az egyes kezeléseket követően. Szignifikáns változások: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 8$.

PP1 gátlás és UVA besugárzás hatása a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára Balb/c egerekben

A szövetminták második felét Wester blot analízissel vizsgáltuk. A szövetdarabok roncsolása és feltárása után a gélen elválasztott és nitrocellulóz membránra transzferált mintákat anti-keratin 1, anti-keratin 10, anti-S100A8 és anti-hiszton 1b antitesttel inkubáltuk. Várakozásunknak megfelelően a keratin 1 és keratin 10 fehérjék mennyisége PP1 gátlást, UVA besugárzást és a két együttes kezelést követően megnövekedett (42. A és B ábra). Az S100A8 fehérje expressziója UVA kezelés és a kombinált kezelés során szignifikánsan megemelkedett, de PP1 gátlást követően ebben az esetben sem tapasztaltunk növekedést (42. C ábra), akárcsak HaCaT sejtek esetében. A hiszton 1b fehérje mennyisége a kontrollhoz viszonyítva az egyes kezeléseket után lecsökkent (42. D ábra).



42. ábra PP1 gátlás és UVA besugárzás hatása a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék expressziójára egérbőr mintákon.

Kontroll kezeletlen, PP1c gátolt (TM kezelés) és/vagy UVA besugárzott (összesen 531 J/cm^2) egérbőr minták lizátumát vizsgáltuk Western blot analízissel. A fehérjék expressziós változását anti-keratin 1 (A), anti-keratin 10 (B), anti-S100A8 (C) és anti-hiszton 1b (D) antitestekkel határoztuk meg. A fehérje (keratin 1, keratin 10, S100A8, hiszton 1b)/tubulin denzitometriás analízisét az expressziós jelek optikai intenzitásának összehasonlításával végeztük el. Szignifikáns változások: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n=3$.

MEGBESZÉLÉS

A daganatos megbetegedések során a kóros elváltozásokat hordozó sejtek kemoterápiás szerekkel történő eltávolítása a cél, azonban a kezeléseket során alkalmazott kemoterápiás szerek egyik fő problémája, hogy a daganatos sejtek kemoszenzitivitása, azaz a szerek elleni érzékenysége csökken (Karami és mtsai., 2013; Karami és mtsai., 2014). A protein foszfatázok szerepe még nem teljesen tisztázott ezekben a folyamatokban, habár aktivitás változásuk jelentősége vitathatatlan, mivel a kemoterápiás szerek apoptózist indukáló hatásában a PP2A és PP1 enzimek megnövekedett aktivitását figyelték meg (Ruvolo és mtsai., 2001; Wang és mtsai., 2001). A természetes források közé tartozó UV sugárzások okozta apoptózisban a PP2A szerepét már korábban vizsgálták (Lee és mtsai., 2011), azonban a PP1 szerepe még kevésbé ismert UV-besugárzott keratinocitákban. Munkánk során betekintést kívántunk nyerni a protein foszfatázok, elsősorban a PP1-nek és az aktivitását szabályozó inhibitor KEPI fehérjének a túlélésben betöltött szerepébe leukémiás sejtekben, illetve a PP1 szabályozó funkciójába UV sugárzás által kiváltott változásokban.

PP1 és PP2A szerepe a sejtek életképességének szabályozásában

Korábban már tanulmányozták a PP2A szelektivitást mutató kalikulin-A (CLA) membránpermeabilis toxin hatását leukémiás sejtek túlélésére (Kiss és mtsai., 2008). Jelen munkánk során ugyancsak membránpermeabilis toxint felhasználva, de elsősorban a PP1 szerepét kívántuk tisztázni. Kemoterápiás szerek (citozin arabinozid, etopozid, daunorubicin) alkalmazásakor a CLA túlélést elősegítő tulajdonságát már korábban megfigyelték (Dou és mtsai., 1995; Kiss és mtsai., 2008), azonban a foszfatáz inhibitor hatásának molekuláris háttere csak részben tisztázott. Kísérleteinkben a PP1 szelektivitást mutató tautomicin (TM) szerepét is tanulmányoztuk. A sejtek apoptózisát leukémiás megbetegedések terápiájában gyakran alkalmazott daunorubicinnel (DNR) váltottuk ki. A DNR koncentráció-függő módon a THP-1 és KG-1 sejtek életképességét csökkentette. Eredményeink szerint a PP2A-t gátló 50 nM CLA (Yan és Mumby, 1999) és a PP1-t gátló μM TM (Favre és mtsai., 1997) önmagában alkalmazva kismértékű sejtpusztulást eredményez THP-1 és KG-1 leukémiás sejtekben egyaránt. A CLA és TM előkezelés a DNR által kiváltott apoptózist mérsékelte, még a legnagyobb DNR koncentráció alkalmazása során is. Az életképesség csökkenésével párhuzamosan az apoptózis egyik korai jeleként, megnövekedett kaszpáz-3 aktivitást is detektáltunk DNR, CLA és TM kezelést követően. A CLA-val vagy TM-nel történő 1 órás

előkezelés a DNR által kiváltott sejthalál mértékét csökkentette, azonban csak a CLA-val történő előkezelés redukálta a kaszpáz-3 aktivitást, míg a TM előkezelés hatástalannak bizonyult. Ezek a megfigyelések feltételezik, hogy a PP1 és PP2A különböző jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozza és csökkenti a DNR kezelés okozta apoptózist. Mindennek a hátterében a retinoblasztóma fehérje (pRb) megváltozott foszforilációja is állhat, hiszen irodalmi adatok alapján ismert, hogy a pRb, ami a sejtciklus szabályozás egyik fontos eleme, citozin-arabinozid és etopozid (Dou és mtsai., 1995), valamint DNR (Kiss és mtsai., 2008) kezelés hatására defoszforilálódik és degradálódik. Az is ismert, hogy leukémiás sejtekben a CLA kezelés csökkent pRb degradációt eredményez (Kiss és mtsai., 2008), ami a megnövekedett túléléshez vezet. Az irodalmi adatokat és eredményeinket összevetve feltételezhető, hogy a DNR pRb defoszforiláló és degradáló hatását ellensúlyozza a CLA és TM kezelés, hiszen a toxinokkal történő előkezelés megnövelte a pRb fehérje foszforilációját a Thr826 oldalláncon, ami az E2F1 faktor kötésért, és ezáltal a sejtciklus szabályozásért felelős foszforilációs helyek egyike. Egyéb, túlélés szabályozásában részt vevő fehérjékről (Erk1/2, Akt) ismert, hogy a PP2A által szabályozott foszforilációjuk/defoszforilációjuk a sejtek túléléséhez vezet (Martelli és mtsai., 2011; Steelman és mtsai., 2011). Vizsgálataink során CLA kezelést/előkezelést követően megnövekedett Erk1/2^{pT202/pY204} és Akt^{pT473} szintet detektáltunk, ami tovább erősíti a PP2A túlélés szabályozásában betöltött szerepét leukémiás sejtekben. A TM előkezelés annak ellenére, hogy fokozott túlélést eredményezett, nemcsak a DNR által kiváltott kaszpáz-3 aktivitás mérséklésére volt hatástalan, de TM kezelés/előkezelés a pRb fehérjén kívül nem növelte meg az Erk1/2, Akt fehérjék foszforilációs szintjét sem. Mindezekből úgy véljük, hogy a PP1 és PP2A foszfatázok külön utakon eredményezik a sejtek túlélését DNR kezelést követően, azonban egy közös pont lehet a pRb Thr826 aminosav oldallánc foszforilációjának szabályozása közvetett vagy közvetlen módon.

KEPI inhibitor fehérje hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára

A pRb Thr826 aminosav oldalláncának defoszforilációját PP1c izoformák végzik (Liu és mtsai., 2006), de ezek a sejtekben a feltételezések szerint holoenzimként, regulátor alegységhez kapcsolódva vannak jelen. A PP1c katalitikus alegység különböző regulátor alegységekhez kötődhet, és ezek eltérően befolyásolhatják a pRb defoszforilációját. Így pl. a PNUTS alegységgel alkotott PP1 holoenzim csökkenti a PP1c aktivitását (De Leon és mtsai., 2008), míg a MYPT1 alegységgel alkotott holoenzim esetében megnövelt PP1c aktivitást

tapasztaltak a foszfo-pRb iránt (Kiss és mtsai., 2008). Mivel a MP aktivitását a MYPT1 regulátor alegység gátló helyeinek (Thr696 és Thr853) foszforilációja (Hartshorne és mtsai., 2004; Ito és mtsai., 2004), illetve foszforiláció függő inhibitor fehérjék (pl. CPI-17, KEPI) befolyásolhatják (Erdődi és mtsai., 2003; Eto, 2009), indokoltnak tűnt megvizsgálni, hogy a CLA és TM kezelés hogyan befolyásolja a MYPT1 regulátor alegység gátló helyeinek (Thr696 és Thr 853), a CPI-17 (Thr38) és KEPI gátló helyének (Thr73) a foszforilációs folyamatait. Korábban már kimutatták, hogy PP2A-t gátló koncentrációban OA kezelés HepG2 sejtekben (Lontay és mtsai., 2005), valamint CLA kezelés simaizom sejtekben (Murányi és mtsai., 2005) és THP-1 sejtekben (Kiss és mtsai., 2008) a MYPT1 gátló foszforilációs helyei foszforilációjának megemelkedését okozza a PP2A protein foszfatáz gátlása révén. Irodalmi adatokból ismert, hogy a CPI-17 nagymértékben expresszálódik számos daganatos sejtvonalban, ami a gátló helyek (MP MYPT1 alegységén található Thr696 és Thr853) foszforilációja mellett szintén eredményezheti a MP csökkent aktivitását (Jin és mtsai., 2006). Ezek ismeretében CLA és TM kezelést követően vizsgáltuk a MYPT1 gátló helyek foszforilációját, illetve a lehetséges inhibitor fehérjék jelenlétét és a kezeléseket követően bekövetkező aktivációját THP-1 sejtekben. CLA kezelés hatására megnőtt a MYPT1 gátló helyek, és a THP-1 sejtekben azonosított KEPI fehérje gátló aminosav oldalláncának (Thr73) foszforilációja. TM-nel történő kezelés során nem tapasztaltunk foszforilációs szint emelkedését az említett aminosav oldalláncokon (MYPT1^{pT696}, MYPT1^{pT853}, KEPI^{pT73}). Ezek az eredmények megerősítik azokat az irodalmi adatokat, amely szerint TM-nel történő PP1c gátlás nem befolyásolja a PP1c-MYPT1 komplex autodefoszforilációját (Khasnis és mtsai., 2014). Ezzel összhangban jelen eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a PP1c nem defoszforilálja a KEPI fehérje foszforilált gátló aminosav oldalláncát sem. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a kezeletlen és CLA vagy TM kezelt THP-1 sejtekben tapasztalt magas pRb^{pT826} szint kialakításában elsődlegesen a PP1c-nek, illetve a foszforiláció függő PP1 gátló KEPI fehérjének lehet szerepe. Továbbá, a PP2A a pRb defoszforilációját közvetett úton szabályozza, a MP MYPT1 alegységének és az inhibitor fehérjéknek a defoszforilációja által.

A PP1 pRb^{pT826} defoszforilációban való részvételét a PP1c csendesítésével is bizonyítani kívántuk. HeLa sejtekben a PP1c expresszió csökkenésével párhuzamosan pRb^{pT826} emelkedést tapasztaltunk, ami megerősítette a PP1 részvételét a pRb defoszforilációjában. Munkacsoportunk korábbi eredményei (Kiss és mtsai., 2008), valamint a jelen THP-1 és HeLa sejteken (PP1c csendesítés) végzett kísérletek tehát egyértelműen bizonyították a PP1 szerepét a pRb Thr826 aminosav oldalláncának defoszforilálásában.

Irodalmi adatok alapján a pRb Thr826 aminosav oldallánc defoszforilálását a PP2A trimer formája is katalizálhatja, amely egy Ca^{2+} -szenzitív 70 kDa méretű B regulátor alegységet tartalmaz. Ez a B alegység képes a pRb-hoz kötődni és elősegíti a defoszforilációt oxidatív stressz, valamint intracelluláris Ca^{2+} -szint növekedést követően (Magenta és mtsai., 2008). Ezt a típusú PP2A holoenzimet, illetve a működéséhez szükséges tényezők (oxidatív stressz, Ca^{2+}) meglétét azonban THP-1 sejtekben még nem mutatták ki.

A PP1 gátló KEPI szerepének igazolására azonban további kísérleteket is végeztünk, amelyekhez MCF-7 sejtvonalat választottunk, hiszen az irodalomból ismert, hogy ezek a sejtek nem tartalmaznak KEPI fehérjét (Wenzel és mtsai., 2007). Míg a pRb a sejtmagban lokalizálódik, addig az overexpresszált Flag-KEPI fehérjét a citoszólban detektáltuk, és vizsgáltuk, hogy a KEPI foszforilációval történő aktiválása eredményez-e sejtmagba történő transzlokációt, ami a KEPI fehérje pRb foszforilációjában játszott szabályozó szerepét elősegítheti. A KEPI fehérje foszforilációját a gátló Thr73 oldalláncon a PKC is katalizálja (Erdődi és mtsai., 2003), ezért a PKC aktiválására PMA kezelést alkalmaztunk, ami a foszforilált KEPI szintjének emelkedését eredményezte. A foszforiláció által aktivált KEPI a sejtmagba transzlokálódott MCF-7 sejtekben, ami növelte a pRb^{pT826} foszforiláció mértékét, további bizonyítékot szolgáltatva a PP1 gátlás pRb szabályozásában betöltött szerepére. A Flag-KEPI foszforilációt követő transzlokációja a citoplazmából a sejtmagba ellentétes az irodalomban a KEPI-hez hasonló CPI-17 fehérjére leírtakkal. Kimutatták, hogy ha a CPI-17 fehérjében a Ser12, vagy a Ser14 és Ser16 aminosav oldalláncok foszforilálva vannak, akkor a sejtmagba történő transzlokáció gátolt (Eto és mtsai., 2013). Mivel a CPI-17 és a KEPI nagyfokú hasonlóságot mutat, így a KEPI fehérjében is megtalálható a gátló szekvenciától azonos távolságban a CPI-17 Ser12 aminosav oldalláncának megfelelő Ser oldallánc (Ser47) az N-terminális régióban. Ha a két fehérje szekvenciáját megvizsgáljuk, megállapítható, hogy a CPI-17 fehérje N-terminális régiójában található egy szekvencia szakasz, amely magába foglalja a Ser12 aminosavat is ($\text{S}^{12}\text{KLQ}^{15}$), ami a KEPI fehérje C-terminális szakaszában ($\text{S}^{127}\text{KLQ}^{130}$) is jelen van. Felvetődik annak a lehetősége is, hogy ez utóbbi szekvencia felelős a sejtmagi lokalizációért, ami a két fehérjében az eltérő terminális helyzetük miatt eltérő lokalizációt is eredményezhet.

A KEPI további vizsgálatához, a THP-1 sejtekben már korábban alkalmazott CLA általi aktivációt MCF-7 sejtekben is megismételtük. Ugyancsak beigazolódt, hogy a PP2A-nak szerepe van a KEPI Thr73 gátló hely foszforilációjának szabályozásában, hiszen 25 nM CLA kezelés hatására megnövekedett a Flag-KEPI transzfektált MCF-7 sejtekben a KEPI^{pT73} foszforilációjának mértéke. Annak ismeretében, hogy transzfektált MCF-7 sejtekben is

aktiválódik a KEPI fehérje CLA kezelés következtében, vizsgáltuk, hogy a CLA kezelés hogyan befolyásolja a pRb Thr826 oldallánc foszforilációs szintjét. A CLA-val történő PP2A gátlás a nem transzfektált, azaz KEPI fehérjét nem tartalmazó MCF-7 sejtekben is pRb^{pT826} foszforilációs szint emelkedést eredményezett, ez azonban feltehetően más folyamatoknak a következménye. Ezek közé a folyamatok közé tartozhat például, hogy a CLA növeli a MYPT1 foszforiláló kinázok működését és/vagy gátolja a defoszforilációt végző foszfatázok aktivitását (Lontay és mtsai., 2005; Kiss és mtsai., 2008). A KEPI fehérje transzfekciója már önmagában pRb^{pT826} foszforilációs növekedéshez vezetett, ami még kifejezettebbé vált, ha a KEPI-t CLA-val aktiváltuk. Ezek az eredmények összhangban állnak a PP1 inhibitor fehérjék jelentőségének feltételezett szerepével a pRb defoszforilációjában, ugyanis egy másik PP1 gátló fehérje, az IPP5 (inhibitor-5 of protein phosphatase) overexpresszióját követően is megnövekedett foszfo-pRb szintet detektáltak SW480 sejtekben (Wang és mtsai., 2008).

PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata HaCaT keratinocita sejtekben

Általánosságban, így a keratinocitákra jellemzően is elmondható, hogy a fehérjék foszforilációs/defoszforilációs állapotának meghatározó szerepe van a sejtek működésében, akár normál, akár UV sugárzások következményeként létrejött patológiás körülmények között (Heck és mtsai., 2004; Syed és mtsai., 2012). A jellemző protein foszfatázok közül a PP2A és PP2B szerepét részletesebben vizsgálták az UV sugárzás indukálta apoptózisban, az epidermisz barrier funkciójának kialakításában és az epidermisz differenciációban (Edwards és Thomas, 2000; Lee és mtsai., 2011), azonban a PP1 szerepe még kevésbé tanulmányozott.

Korábban már kimutatták, hogy a PP1c izoformáknak eltérő a lokalizációja HeLa sejtekben (Andreassen és mtsai., 1998), ami eltérő funkció lehetőségére utal. HaCaT sejtek szubcelluláris frakcióinak Western blottal, immunfluoreszcenciával és foszfatáz aktivitás méréssel történő vizsgálatával arra az eredményre jutottunk, hogy α PP1c főleg a citoplazmában található és csak kis mennyiségben van jelen a sejtmagban, ezzel szemben a PP1c δ izoforma dominánsan lokalizálódik a sejtmagban is, és feltehetően ez az izoforma befolyásolja a génextpressziós változásokat is. Ez a megfigyelés összhangban áll Fernandez és munkatársai eredményeivel, miszerint a PP1c δ G β ziában a sejtmagban lokalizálódik elsősorban, és feltehetőleg részt vesz a génextpresszió szabályozásában (Fernandez és mtsai., 1992). Kerestük, hogy melyik az a minimális UV dózis, amely már szignifikánsan befolyásolja a protein foszfatázok aktivitását, azonban a HaCaT sejtek életképességét nem gátolja teljes mértékben. Azt meg kell említeni, hogy a foszfatáz aktivitás vizsgálatokor mind

a PP1, mind a PP2A aktivitását detektáltuk és UVA sugárzás hatására mindkét foszfatáz részben inaktiválódott. Irodalmi adatok alapján az UVA sugárzás reaktív oxigén gyökök keletkezését indukálja (Svobodova és mtsai., 2003), és ezek a PP1 és PP2A enzimek katalitikus centrumában található aminosavak és fémionok oxidálásával a foszfatáz aktivitás gátlását is okozhatják (Kim és mtsai., 2003). Mindezek alátámasztják azt az elképzelést, hogy UVA sugárzás során a PP1 és PP2A enzimekben bekövetkező változások vezethetnek a sejtek életképességének általunk tapasztalt csökkenéséhez. Lee és munkatársai eredményei azonban ellent mondanak az általunk tapasztaltaknak, mivel kísérleteik során PP2A aktivációt figyeltek meg UV besugárzást követően (Lee és mtsai., 2011). Az ellentmondás oka lehet, hogy kísérleteik során az UVB sugárzás hatásait vizsgálták jelentősen eltérő dózis (70 J/m^2) alkalmazásával. Irodalmi adatokat, amelyek szerint a normál napi UVA dózis $10\text{-}18 \text{ J/cm}^2$ -nek felel meg (Staberg és mtsai., 1983), illetve életképesség és foszfatáz aktivitás vizsgálatunkat is figyelembe véve, a kísérletekben, a továbbiakban a 10 J/cm^2 UVA dózist választottuk. Az UVB sugárzás hatásait nem vizsgáltuk, mivel még a legmagasabb dózis (2 J/cm^2) sem csökkentette a foszfatáz aktivitást, és a sejtek kb. 50 %-os túlélését eredményezte. Az UVA sugárzás hatásainak vizsgálata mellett szólnak azok a megfigyelések és irodalmi adatok is, miszerint az UVB sugárzás elsősorban DNS károsodást és fototermekek kialakulását okozza (Rosenstein és Mitchell, 1987).

A PP1c szerepének célzott vizsgálatára PP1c izoformák csendesítését végeztük el HaCaT sejtekben, és ezt követően vizsgáltuk a sejtek életképességét és foszfatáz aktivitását is. A csendesítés sikerességét Western blot analízis és a foszfatáz aktivitás csökkenése is igazolta. Ezzel szemben az UVA sugárzás nem befolyásolja a PP1c izoformák expresszióját, ami arra utal, hogy az aktivitás mérés során tapasztalt foszfatáz gátlás nem az expressziós szint csökkenésének az eredménye. A PP1c csendesítése után tapasztalt életképesség csökkenés a PP1 kiemelkedő szerepét támasztja alá a HaCaT keratinociták homeosztázisának a fenntartásában.

A PP1c izoformák és az UVA besugárzás génexpressziót szabályozó szerepének vizsgálatára microarray analízist végeztünk. Csendesítést és UVA besugárzást követően olyan gének expressziós változását figyeltük meg, amelyeknek szerepe van a szabadgyök megkötésben (free radical scavenging), a sejtciklus és sejthalál szabályozásban, a DNS javításban, valamint a sejt morfológia kialakításában. Kitüntetett figyelmet fordítottunk egyes fehérjék, így a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b génexpressziós változásaira, hiszen ezeket együttesen melanóma markereknek is nevezik (Karantza, 2011). A tapasztalt génexpressziós változások fehérjeszinten is érvényesültek, azaz megnövekedett keratin 1,

keratin 10 és S100A8, valamint csökkent hiszton 1b mennyiséget detektáltunk Western blot analízissel PP1c csendesítés és UVA besugárzás együttes hatására. Mivel a keratin molekulák vesznek részt az intermedier filamentumok és ezáltal a sejt morfológiájának és motilitásának szabályozásában, így az általunk tapasztalt megnövekedett keratin 1/10 fehérjeszint PP1c csendesítés és/vagy UVA besugárzást követően a tumoros bőrsejtek nagyfokú invazív tulajdonságát és fokozott migrációs képességét eredményezheti. Sőt, keratin 1 fehérje immunfluoreszcenciás vizsgálata során PP1c csendesített és/vagy UVA besugárzott, és ezáltal csökkent foszfatáz aktivitást mutató HaCaT sejtekben perinukleáris lokalizációt figyeltünk meg. Megfigyeléseinket alátámasztja, hogy ilyen intermedier filamentum újra-rendeződést mikrocisztin-LR-rel kezelt, azaz foszfatáz aktivitásában gátolt májsejtekben már korábban kimutattak (Toivola és mtsai., 1997).

PP1c szerepének és UVA besugárzás hatásának vizsgálata Balb/c egerekben

Keratinocitákon végzett kísérletek eredményeit szeretnénk volna megerősíteni egérmodell rendszert használva. Mivel nem rendelkezünk PP1c knock-out egerekkel, ezért a PP1 szerepének tanulmányozására TM inhibitort használtunk olyan koncentrációban, amelyben a PP1-et szelektíven gátolja (1 μ M) (Favre és mtsai., 1997). A minimális eritmiás, azaz bőrpírt okozó UVA dózist (510 J/cm²) már korábban meghatározták (Lavker és mtsai., 1995), így Balb/c egérmodellt használva az egyedeket összesen 531 J/cm² UVA dózissal sugároztuk be. Irodalmi adatokkal összhangban a szövettani vizsgálatainkból kiderült, hogy az UVA sugárzásnak, TM kezelésnek vagy a két kezelés kombinációjának kitett bőr esetében elsősorban az epidermisz, az epidermális szövetszaporulat (epidermal hyperplasia) tüneteként megvastagodott, de gyulladáisos elváltozásokat nem tapasztaltunk (Lavker és mtsai., 1995). A kezelt bőrfelületek másik feléből Western blot analízissel vizsgáltuk, hogy a már említett fehérjék (keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b) expressziós szintje követi-e a HaCaT keratinociták esetében tapasztalt változásokat. A kontroll kezeletlen bőrfelületekhez képest a TM-el kezelt, azaz PP1 gátolt mintákban megnövekedett a keratin 1, keratin 10 és S100A8 fehérjék mennyisége, azonban ez a növekedés szignifikáns eltérést mutatott, miután a bőrfelületeket UVA-val besugároztuk, vagy ha kombinált kezelést alkalmaztunk. A keratinocitákkal végzett kísérletekkel ugyancsak megegyező, de nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, ha a minták hiszton 1b expressziós mennyiségét vizsgáltuk. A HaCaT keratinocitákon és Balb/c egereken végzett kísérletek eredményeiből egyértelmű bizonyítékot

nyertünk arra nézve, hogy a bőr egészséges homeosztázis szabályozásában a PP1 típusú enzimeknek kitüntetett szerepe van.

Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a PP1 enzimnek nemcsak citoskeletális és citoszólikus folyamatok szabályozásában van szerepe, de UVA besugárzott keratinociták génexpressziós szabályozásában is részt vesznek. Mindezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a bőr daganatos megbetegedéseinek kezelése során a protein foszfatáz enzimek akár új terápiás célpontokká válhatnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek számos sejt folyamat, így pl. az apoptózis és sejtciklus szabályozásában, ill. környezeti tényezők patológiás elváltozásokat indukáló hatásaiban is szerepet játszanak, azonban funkciójuk még nem minden részletében tisztázott ezekben a folyamatokban. Kísérleteink során tanulmányoztuk a PP1 és PP2A szerepét a sejtciklus egyik fontos szabályozó elemének tekinthető retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációjának szabályozásában, illetve keratinociták UV-sugárzások által indukált patológiás folyamataiban.

Kimutattuk, hogy a leukémiás megbetegedések terápiája során gyakran alkalmazott daunorubicin (DNR) sejthalált kiváltó hatékonysága THP-1 és KG-1 leukémiás sejtvonalakon a PP2A-t specifikusan gátló kalikulin-A (CLA), és a PP1-et specifikusan gátló tautomycin (TM) toxinok jelenlétében jelentősen mérséklődik, ami a foszfatáz gátlás kemoszenzitivitást csökkentő hatására utal. A PP1 és a PP2A hatásában közös, hogy mindkét enzim gátlása fokozza a pRb foszforilációját és ezzel elősegíthetik a sejtciklus G₁S átmenet DNR által történő gátlásának részleges feloldását. PP1 katalitikus alegység (PP1c) csendesítési kísérletek HeLa sejteken, valamint a PP1 inhibitor KEPI fehérje expressziója és foszforilációjának indukálása MCF-7 sejtekben arra utaltak, hogy a pRb defoszforilációját közvetlenül PP1 katalizálja, a PP2A pedig a PP1 inhibitor fehérjék foszforilációján keresztül szabályozza a pRb foszforilációjának mértékét.

A PP1c csendesítése HaCaT keratinociták életképességének csökkenését eredményezte. HaCaT sejtek UVA besugárzása sejthalált és ezzel párhuzamosan a PP1 aktivitás csökkenését okozta a PP1c izoformák expressziójának változása nélkül. A PP1 csendesítés és UVA sugárzás együttes hatására 19 gén expressziójának szignifikáns változását figyeltük meg, amelyek közül a melanóma markerekként ismert keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b expressziós szintjének változását fehérje szinten is bizonyítottuk egerek bőrének PP1 inhibitorral, UVA besugárzással és ezek kombinációjával történő kezelések során is.

Összefoglalva: eredményeink rávilágítanak arra, hogy a protein foszfatázok fontos szerepet töltenek be a leukémia kezelése során fellépő kemorezisztencia kialakulásában, valamint kiemelkedő szerepük van a keratinociták homeosztázisának fenntartásában. E megfigyelések is erősítik azt az elképzelést, hogy a protein foszfatáz enzimek akár új terápiás célpontokká is válhatnak különböző betegségek kezelésében.

SUMMARY

The protein phosphatase-1 (PP1) and -2A (PP2A) play important roles in the regulation of apoptosis and cell cycle as well as in pathological cellular processes induced by environmental stresses. However, the role of PP1 and PP2A has not been revealed in details in these processes. Our studies have been focused on the role of PP1 and PP2A in the regulation of retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation, a key mediator of cell cycle, and in the UVA-induced pathological changes of human keratinocytes and mouse skin.

In THP-1 and KG-1 leukemic cells the cell-death inducing efficacy of daunorubicin (DNR), a chemotherapeutic agent often applied to treat leukemia, decreased profoundly during specific inhibition of PP2A by calyculin-A (CLA) or PP1 by tautomycin (TM) suggesting that phosphatase inhibition was coupled with decreased chemosensitivity to DNR. In these influences a common theme was that both PP1 and PP2A inhibition enhanced the phosphorylation level of pRb which might help proceeding through G1→S transition in cell cycle suppressed by DNR. Silencing PP1 catalytic subunit (PP1c) in HeLa cells as well as expression of a PP1 inhibitor KEPI protein with inducing its phosphorylation in MCF-7 cells suggested that direct dephosphorylation of pRb occurred by PP1 while PP2A mediates pRb phosphorylation level via regulation of the dephosphorylation of PP1 inhibitory proteins.

Silencing PP1c isoforms in HaCaT cells resulted in decrease of cell viability. UVA-irradiation also induced cell-death of HaCaT cells and in parallel decrease in PP1 activity without causing any change in the expression of PP1c isoforms. The combined effect of PP1c silencing and UVA-irradiation affected significantly the expression of 19 genes of which keratin 1, keratin 10, S100A8 and histone 1b are known as melanoma marker proteins. The changes in the expression of these genes on the protein levels were observed in mouse skin treated with TM, UVA-irradiation and the combined effect of TM and UVA.

In summary, our results indicate that protein phosphatases may be implicated in the development of chemoresistance to chemotherapeutic drugs during leukemia treatment as well as they are involved in the maintenance of normal homeostasis of keratinocytes. These data also confirm the presumption that protein phosphatases may be considered as novel drug targets in the therapeutics of distinct diseases.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Andreassen, P. R., F. B. Lacroix, E. Villa-Moruzzi and R. L. Margolis (1998). "Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells." *J Cell Biol* **141**(5): 1207-1215.
2. Barford, D. (1995). "Protein phosphatases." *Curr Opin Struct Biol* **5**(6): 728-734.
3. Bertolotto, C. (2013). "Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options." *Scientifica (Cairo)* **2013**: 635203.
4. Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond." *Dev Cell* **14**(2): 159-169.
5. Bickenbach, J. R. (2005). "Isolation, characterization, and culture of epithelial stem cells." *Methods Mol Biol* **289**: 97-102.
6. Brown, D. T., B. T. Alexander and D. B. Sittman (1996). "Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression." *Nucleic Acids Res* **24**(3): 486-493.
7. Butler, T., J. Paul, N. Europe-Finner, R. Smith and E. C. Chan (2013). "Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility." *Am J Physiol Cell Physiol* **304**(6): C485-504.
8. Candi, E., R. Schmidt and G. Melino (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 328-340.
9. Canepa, E. T., M. E. Scassa, J. M. Ceruti, M. C. Marazita, A. L. Carcagno, P. F. Sirkin and M. F. Ogara (2007). "INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions." *IUBMB Life* **59**(7): 419-426.
10. Cao, C. and Y. Wan (2009). "Parameters of protection against ultraviolet radiation-induced skin cell damage." *J Cell Physiol* **220**(2): 277-284.
11. Ceulemans, H., W. Stalmans and M. Bollen (2002). "Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution." *Bioessays* **24**(4): 371-381.
12. Chatfield, K. and A. Eastman (2004). "Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways." *Biochem Biophys Res Commun* **323**(4): 1313-1320.
13. Chellappan, S. P., S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz and J. R. Nevins (1991). "The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein." *Cell* **65**(6): 1053-1061.

14. Chen, H., C. Xu, Q. Jin and Z. Liu (2014). "S100 protein family in human cancer." *Am J Cancer Res* **4**(2): 89-115.
15. Chen, J., S. Parsons and D. L. Brautigan (1994). "Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts." *J Biol Chem* **269**(11): 7957-7962.
16. Cheng, X., R. L. Bennett, X. Liu, M. Byrne and W. Stratford May (2013). "PKR negatively regulates leukemia progression in association with PP2A activation, Bcl-2 inhibition and increased apoptosis." *Blood Cancer J* **3**: e144.
17. Cheng, X. C., T. Kihara, H. Kusakabe, J. Magae, Y. Kobayashi, R. P. Fang, Z. F. Ni, Y. C. Shen, K. Ko, I. Yamaguchi and et al. (1987). "A new antibiotic, tautomycin." *J Antibiot (Tokyo)* **40**(6): 907-909.
18. Cohen, P. T. (1997). "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life." *Trends Biochem Sci* **22**(7): 245-251.
19. Cohen, P. T. (2002). "Protein phosphatase 1--targeted in many directions." *J Cell Sci* **115**(Pt 2): 241-256.
20. Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 110-122.
21. Cui, R., H. R. Widlund, E. Feige, J. Y. Lin, D. L. Wilensky, V. E. Igras, J. D'Orazio, C. Y. Fung, C. F. Schanbacher, S. R. Granter and D. E. Fisher (2007). "Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation." *Cell* **128**(5): 853-864.
22. De Leon, G., T. C. Sherry and N. A. Krucher (2008). "Reduced expression of PNUTS leads to activation of Rb-phosphatase and caspase-mediated apoptosis." *Cancer Biol Ther* **7**(6): 833-841.
23. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha and D. M. Livingston (1988). "SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene." *Cell* **54**(2): 275-283.
24. Dent, P. and S. Grant (2001). "Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action." *Clin Cancer Res* **7**(4): 775-783.
25. Di Marco, A., G. Cassinelli and F. Arcamone (1981). "The discovery of daunorubicin." *Cancer Treat Rep* **65 Suppl 4**: 3-8.
26. Dick, F. A. and S. M. Rubin (2013). "Molecular mechanisms underlying RB protein function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(5): 297-306.

27. Dombradi, V., J. M. Axton, N. D. Brewis, E. F. da Cruz e Silva, L. Alphey and P. T. Cohen (1990). "Drosophila contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1." *Eur J Biochem* **194**(3): 739-745.
28. Dou, Q. P., B. An and P. L. Will (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**(20): 9019-9023.
29. Durfee, T., K. Becherer, P. L. Chen, S. H. Yeh, Y. Yang, A. E. Kilburn, W. H. Lee and S. J. Elledge (1993). "The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit." *Genes Dev* **7**(4): 555-569.
30. Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." *Genes Dev* **12**(15): 2245-2262.
31. Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger and E. Harlow (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* **243**(4893): 934-937.
32. Eckert, R. L., J. F. Crish and N. A. Robinson (1997). "The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation." *Physiol Rev* **77**(2): 397-424.
33. Edwards, M. J. and R. C. Thomas (2000). "Protein phosphatase type 1-dependent dephosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor protein in ultraviolet-irradiated human skin and keratinocytes." *J Invest Dermatol* **115**(1): 88-94.
34. Egloff, M. P., P. T. Cohen, P. Reinemer and D. Barford (1995). "Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate." *J Mol Biol* **254**(5): 942-959.
35. Egloff, M. P., D. F. Johnson, G. Moorhead, P. T. Cohen, P. Cohen and D. Barford (1997). "Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1." *EMBO J* **16**(8): 1876-1887.
36. Erdodi, F., E. Kiss, M. P. Walsh, B. Stefansson, J. T. Deng, M. Eto, D. L. Brautigan and D. J. Hartshorne (2003). "Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(2): 382-387.
37. Erdodi, F., B. Toth, K. Hirano, M. Hirano, D. J. Hartshorne and P. Gergely (1995). "Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo." *Am J Physiol* **269**(5 Pt 1): C1176-1184.
38. Eto, M. (2009). "Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors." *J Biol Chem* **284**(51): 35273-35277.
39. Eto, M. and D. L. Brautigan (2012). "Endogenous inhibitor proteins that connect Ser/Thr kinases and phosphatases in cell signaling." *IUBMB Life* **64**(9): 732-739.

40. Eto, M., J. A. Kirkbride, R. Chugh, N. K. Karikari and J. I. Kim (2013). "Nuclear localization of CPI-17, a protein phosphatase-1 inhibitor protein, affects histone H3 phosphorylation and corresponds to proliferation of cancer and smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **434**(1): 137-142.
41. Eto, M., S. Senba, F. Morita and M. Yazawa (1997). "Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle." *FEBS Lett* **410**(2-3): 356-360.
42. Favre, B., P. Turowski and B. A. Hemmings (1997). "Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin." *J Biol Chem* **272**(21): 13856-13863.
43. Fernandez, A., D. L. Brautigan and N. J. Lamb (1992). "Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit." *J Cell Biol* **116**(6): 1421-1430.
44. Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, M. Komine and M. Blumenberg (2001). "Keratins and the keratinocyte activation cycle." *J Invest Dermatol* **116**(5): 633-640.
45. Gaggioli, C., R. Busca, P. Abbe, J. P. Ortonne and R. Ballotti (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes." *Pigment Cell Res* **16**(4): 374-382.
46. Gandarillas, A. (2000). "Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways?" *Exp Gerontol* **35**(1): 53-62.
47. Gilchrest, B. A., M. S. Eller, A. C. Geller and M. Yaar (1999). "The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation." *N Engl J Med* **340**(17): 1341-1348.
48. Goldberg, J., H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn and J. Kuriyan (1995). "Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1." *Nature* **376**(6543): 745-753.
49. Gong, J. P., Q. R. Liu, P. W. Zhang, Y. Wang and G. R. Uhl (2005). "Mouse brain localization of the protein kinase C-enhanced phosphatase 1 inhibitor KEPI (kinase C-enhanced PP1 inhibitor)." *Neuroscience* **132**(3): 713-727.
50. Groves, M. R., N. Hanlon, P. Turowski, B. A. Hemmings and D. Barford (1999). "The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs." *Cell* **96**(1): 99-110.
51. Hartshorne, D. J., M. Ito and F. Erdodi (2004). "Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase." *J Biol Chem* **279**(36): 37211-37214.
52. Hayashi, Y., S. Senba, M. Yazawa, D. L. Brautigan and M. Eto (2001). "Defining the structural determinants and a potential mechanism for inhibition of myosin

- phosphatase by the protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa." *J Biol Chem* **276**(43): 39858-39863.
53. He, Y. Y., J. L. Huang and C. F. Chignell (2004). "Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis." *J Biol Chem* **279**(51): 53867-53874.
54. Heck, D. E., D. R. Gerecke, A. M. Vetrano and J. D. Laskin (2004). "Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction." *Toxicol Appl Pharmacol* **195**(3): 288-297.
55. Hemmings, H. C., Jr., A. C. Nairn and P. Greengard (1984). "DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1." *J Biol Chem* **259**(23): 14491-14497.
56. Hirobe, T. (2005). "Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes." *Pigment Cell Res* **18**(1): 2-12.
57. Hirschi, A., M. Cecchini, R. C. Steinhardt, M. R. Chamber, F. A. Dick and S. M. Rubin (2010). "An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein." *Nat Struct Mol Biol* **17**(9): 1051-1057.
58. Honigsmann, H., G. Schuler, W. Aberer, N. Romani and K. Wolff (1986). "Immediate pigment darkening phenomenon. A reevaluation of its mechanisms." *J Invest Dermatol* **87**(5): 648-652.
59. Huang, F. L. and W. H. Glinsmann (1976). "Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle." *Eur J Biochem* **70**(2): 419-426.
60. Hubbard, M. J. and P. Cohen (1993). "On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation." *Trends Biochem Sci* **18**(5): 172-177.
61. Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell* **80**(2): 225-236.
62. Hur, S., H. Lee, Y. Kim, B. H. Lee, J. Shin and T. Y. Kim (2008). "Sargaquinoic acid and sargachromenol, extracts of *Sargassum sagamianum*, induce apoptosis in HaCaT cells and mice skin: Its potentiation of UVB-induced apoptosis." *Eur J Pharmacol* **582**(1-3): 1-11.
63. Ingebritsen, T. S. and P. Cohen (1983). "Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation." *Science* **221**(4608): 331-338.
64. Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi and D. J. Hartshorne (2004). "Myosin phosphatase: structure, regulation and function." *Mol Cell Biochem* **259**(1-2): 197-209.

65. Janssens, V. and J. Goris (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." *Biochem J* **353**(Pt 3): 417-439.
66. Janssens, V., J. Goris and C. Van Hoof (2005). "PP2A: the expected tumor suppressor." *Curr Opin Genet Dev* **15**(1): 34-41.
67. Jin, H., T. Sperka, P. Herrlich and H. Morrison (2006). "Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase." *Nature* **442**(7102): 576-579.
68. Karami, H., B. Baradaran, A. Esfahani, M. A. Estiar, M. Naghavi-Behzad, M. Sakhinia and E. Sakhinia (2013). "siRNA-mediated silencing of survivin inhibits proliferation and enhances etoposide chemosensitivity in acute myeloid leukemia cells." *Asian Pac J Cancer Prev* **14**(12): 7719-7724.
69. Karami, H., B. Baradaran, A. Esfehiani, M. Sakhinia and E. Sakhinia (2014). "Down-regulation of Mcl-1 by small interference RNA induces apoptosis and sensitizes HL-60 leukemia cells to etoposide." *Asian Pac J Cancer Prev* **15**(2): 629-635.
70. Karantza, V. (2011). "Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers." *Oncogene* **30**(2): 127-138.
71. Kato, Y., N. Fusetani, S. Matsunaga and K. Hashimoto (1988). "Calyculins, potent antitumour metabolites from the marine sponge Discodermia calyx: biological activities." *Drugs Exp Clin Res* **14**(12): 723-728.
72. Khasnis, M., A. Nakatomi, K. Gumper and M. Eto (2014). "Reconstituted human myosin light chain phosphatase reveals distinct roles of two inhibitory phosphorylation sites of the regulatory subunit, MYPT1." *Biochemistry* **53**(16): 2701-2709.
73. Kim, H. S., M. C. Song, I. H. Kwak, T. J. Park and I. K. Lim (2003). "Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence." *J Biol Chem* **278**(39): 37497-37510.
74. Kiss, A., B. Lontay, B. Becsi, L. Markasz, E. Olah, P. Gergely and F. Erdodi (2008). "Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A." *Cell Signal* **20**(11): 2059-2070.
75. Kita, A., S. Matsunaga, A. Takai, H. Kataiwa, T. Wakimoto, N. Fusetani, M. Isobe and K. Miki (2002). "Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1." *Structure* **10**(5): 715-724.
76. Koch, P. J. and D. R. Roop (2004). "The role of keratins in epidermal development and homeostasis--going beyond the obvious." *J Invest Dermatol* **123**(5): x-xi.
77. Kolupaeva, V. and V. Janssens (2013). "PP1 and PP2A phosphatases--cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation." *FEBS J* **280**(2): 627-643.

78. Kornblau, S. M., M. Andreeff, S. X. Hu, H. J. Xu, S. Patel, A. Theriault, C. Koller, H. Kantarjian, E. Estey, A. B. Deisseroth and W. F. Benedict (1998). "Low and maximally phosphorylated levels of the retinoblastoma protein confer poor prognosis in newly diagnosed acute myelogenous leukemia: a prospective study." *Clin Cancer Res* **4**(8): 1955-1963.
79. Kuntziger, T., H. B. Landsverk, P. Collas and R. G. Syljuasen (2011). "Protein phosphatase 1 regulators in DNA damage signaling." *Cell Cycle* **10**(9): 1356-1362.
80. Lavker, R. M., D. A. Veres, C. J. Irwin and K. H. Kaidbey (1995). "Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin." *Photochem Photobiol* **62**(2): 348-352.
81. Lee, E. R., J. H. Kim, H. Y. Choi, K. Jeon and S. G. Cho (2011). "Cytoprotective effect of eriodictyol in UV-irradiated keratinocytes via phosphatase-dependent modulation of both the p38 MAPK and Akt signaling pathways." *Cell Physiol Biochem* **27**(5): 513-524.
82. Li, T., L. E. Chalifour and H. K. Paudel (2007). "Phosphorylation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent protein kinase 5 during nerve growth factor-induced PC12 cell differentiation." *J Biol Chem* **282**(9): 6619-6628.
83. Liu, C. W., R. H. Wang and N. Berndt (2006). "Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation." *Mol Carcinog* **45**(9): 648-656.
84. Liu, Q. R., P. W. Zhang, Q. Zhen, D. Walther, X. B. Wang and G. R. Uhl (2002). "KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine." *J Biol Chem* **277**(15): 13312-13320.
85. Lontay, B., K. Bodoor, D. H. Weitzel, D. Loiselle, C. Fortner, S. Lengyel, D. Zheng, J. Devente, R. Hickner and T. A. Haystead (2010). "Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy." *J Biol Chem* **285**(38): 29357-29366.
86. Lontay, B., A. Kiss, P. Gergely, D. J. Hartshorne and F. Erdodi (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**(10): 1265-1275.
87. Lontay, B., Z. Serfozo, P. Gergely, M. Ito, D. J. Hartshorne and F. Erdodi (2004). "Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells." *J Comp Neurol* **478**(1): 72-87.
88. Ludlow, J. W., C. L. Glendening, D. M. Livingston and J. A. DeCarpio (1993). "Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein." *Mol Cell Biol* **13**(1): 367-372.
89. MacKintosh, C. and R. W. MacKintosh (1994). "Inhibitors of protein kinases and phosphatases." *Trends Biochem Sci* **19**(11): 444-448.

90. Magenta, A., P. Fasanaro, S. Romani, V. Di Stefano, M. C. Capogrossi and F. Martelli (2008). "Protein phosphatase 2A subunit PR70 interacts with pRb and mediates its dephosphorylation." *Mol Cell Biol* **28**(2): 873-882.
91. Markasz, L., G. Stuber, E. Flaberg, A. G. Jernberg, S. Eksborg, E. Olah, H. Skribek and L. Szekely (2006). "Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells." *BMC Cancer* **6**: 265.
92. Martelli, A. M., C. Evangelisti, W. Chappell, S. L. Abrams, J. Basecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, F. Nicoletti, M. Libra, V. Ruvolo, P. Ruvolo, C. R. Kempf, L. S. Steelman and J. A. McCubrey (2011). "Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway." *Leukemia* **25**(7): 1064-1079.
93. Maynes, J. T., K. S. Bateman, M. M. Cherney, A. K. Das, H. A. Luu, C. F. Holmes and M. N. James (2001). "Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1." *J Biol Chem* **276**(47): 44078-44082.
94. Meiselbach, H., H. Sticht and R. Enz (2006). "Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins." *Chem Biol* **13**(1): 49-59.
95. Mitnacht, S. (2005). "The retinoblastoma protein--from bench to bedside." *Eur J Cell Biol* **84**(2-3): 97-107.
96. Morimoto, Y., T. Ohba, S. Kobayashi and T. Haneji (1997). "The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A induce apoptosis in human osteoblastic cells." *Exp Cell Res* **230**(2): 181-186.
97. Muramatsu, T., N. Kobayashi, H. Tada, M. Yamaji, T. Shirai, T. Mori and T. Ohnishi (1992). "Induction and repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in organ-cultured normal human skin." *Arch Dermatol Res* **284**(4): 232-237.
98. Muranyi, A., D. Derkach, F. Erdodi, A. Kiss, M. Ito and D. J. Hartshorne (2005). "Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells." *FEBS Lett* **579**(29): 6611-6615.
99. Nelson, D. A., N. A. Krucher and J. W. Ludlow (1997). "High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein." *J Biol Chem* **272**(7): 4528-4535.
100. Olsen, J. V., B. Blagoev, F. Gnäd, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen and M. Mann (2006). "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." *Cell* **127**(3): 635-648.
101. Park, H. Y., M. G. Song, J. S. Lee, J. W. Kim, J. O. Jin, J. I. Park, Y. C. Chang and J. Y. Kwak (2007). "Apoptosis of human neutrophils induced by protein phosphatase

- 1/2A inhibition is caspase-independent and serine protease-dependent." *J Cell Physiol* **212**(2): 450-462.
- 102.Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
- 103.Rosenstein, B. S. and D. L. Mitchell (1987). "Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts." *Photochem Photobiol* **45**(6): 775-780.
- 104.Rubin, E., S. Mittnacht, E. Villa-Moruzzi and J. W. Ludlow (2001). "Site-specific and temporally-regulated retinoblastoma protein dephosphorylation by protein phosphatase type 1." *Oncogene* **20**(29): 3776-3785.
- 105.Ruvolo, P. P., X. Deng and W. S. May (2001). "Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis." *Leukemia* **15**(4): 515-522.
- 106.Salama, I., P. S. Malone, F. Mihaimed and J. L. Jones (2008). "A review of the S100 proteins in cancer." *Eur J Surg Oncol* **34**(4): 357-364.
- 107.Sasaki, K., H. Shima, Y. Kitagawa, S. Irino, T. Sugimura and M. Nagao (1990). "Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas." *Jpn J Cancer Res* **81**(12): 1272-1280.
- 108.Schwarz, A., R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T. A. Luger and T. Schwarz (1995). "Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells." *J Invest Dermatol* **104**(6): 922-927.
- 109.Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 22-30.
- 110.Shi, Y. (2009). "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure." *Cell* **139**(3): 468-484.
- 111.Staberg, B., H. C. Wulf, P. Klemp, T. Poulsen and H. Brodthagen (1983). "The carcinogenic effect of UVA irradiation." *J Invest Dermatol* **81**(6): 517-519.
- 112.Steelman, L. S., R. A. Franklin, S. L. Abrams, W. Chappell, C. R. Kempf, J. Basecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, F. Nicoletti, M. Libra, P. Ruvolo, V. Ruvolo, C. Evangelisti, A. M. Martelli and J. A. McCubrey (2011). "Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy." *Leukemia* **25**(7): 1080-1094.
- 113.Steinert, P., R. Zackroff, M. Aynardi-Whitman and R. D. Goldman (1982). "Isolation and characterization of intermediate filaments." *Methods Cell Biol* **24**: 399-419.
- 114.Svobodova, A., J. Psotova and D. Walterova (2003). "Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **147**(2): 137-145.

115. Syed, D. N., F. Afaq and H. Mukhtar (2012). "Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes." *Photochem Photobiol* **88**(5): 1184-1190.
116. Tadokoro, T., N. Kobayashi, B. Z. Zmudzka, S. Ito, K. Wakamatsu, Y. Yamaguchi, K. S. Korossy, S. A. Miller, J. Z. Beer and V. J. Hearing (2003). "UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin." *FASEB J* **17**(9): 1177-1179.
117. Takai, A., K. Sasaki, H. Nagai, G. Mieskes, M. Isobe, K. Isono and T. Yasumoto (1995). "Inhibition of specific binding of okadaic acid to protein phosphatase 2A by microcystin-LR, calyculin-A and tautomycin: method of analysis of interactions of tight-binding ligands with target protein." *Biochem J* **306** (Pt 3): 657-665.
118. Terrak, M., F. Kerff, K. Langsetmo, T. Tao and R. Dominguez (2004). "Structural basis of protein phosphatase 1 regulation." *Nature* **429**(6993): 780-784.
119. Testa, U. and R. Riccioni (2007). "Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia." *Haematologica* **92**(1): 81-94.
120. Thorey, I. S., J. Roth, J. Regenbogen, J. P. Halle, M. Bittner, T. Vogl, S. Kaesler, P. Bugnon, B. Reitmaier, S. Durka, A. Graf, M. Wockner, N. Rieger, A. Konstantinow, E. Wolf, A. Goppelt and S. Werner (2001). "The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes." *J Biol Chem* **276**(38): 35818-35825.
121. Timar, J., J. Harsing and B. Somlai (2013). "[Molecular classification and markers of malignant melanoma]." *Magy Onkol* **57**(2): 73-78.
122. Toivola, D. M., R. D. Goldman, D. R. Garrod and J. E. Eriksson (1997). "Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments." *J Cell Sci* **110** (Pt 1): 23-33.
123. Wang, R. H., C. W. Liu, V. I. Avramis and N. Berndt (2001). "Protein phosphatase 1 α -mediated stimulation of apoptosis is associated with dephosphorylation of the retinoblastoma protein." *Oncogene* **20**(43): 6111-6122.
124. Wang, X., B. Liu, N. Li, H. Li, J. Qiu, Y. Zhang and X. Cao (2008). "IPP5, a novel protein inhibitor of protein phosphatase 1, promotes G1/S progression in a Thr-40-dependent manner." *J Biol Chem* **283**(18): 12076-12084.
125. Wenzel, K., K. Daskalow, F. Herse, S. Seitz, U. Zacharias, J. A. Schenk, H. Schulz, N. Hubner, B. Micheel, P. M. Schlag, K. J. Osterziel, C. Ozcelik, S. Scherneck and B. Jandrig (2007). "Expression of the protein phosphatase 1 inhibitor KEPI is downregulated in breast cancer cell lines and tissues and involved in the regulation of the tumor suppressor EGR1 via the MEK-ERK pathway." *Biol Chem* **388**(5): 489-495.
126. Whyte, P., K. J. Buchkovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg and E. Harlow (1988). "Association between an oncogene and an anti-

oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product." *Nature* **334**(6178): 124-129.

127. Wickremasinghe, R. G. and A. V. Hoffbrand (1999). "Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies." *Blood* **93**(11): 3587-3600.
128. Williams, R. T., L. M. Barnhill, H. H. Kuo, W. D. Lin, A. Batova, A. L. Yu and M. B. Diccianni (2014). "Chimeras of p14ARF and p16: functional hybrids with the ability to arrest growth." *PLoS One* **9**(2): e88219.
129. Xin, M. and X. Deng (2006). "Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation." *J Biol Chem* **281**(27): 18859-18867.
130. Xing, H., Y. Hong and K. D. Sarge (2007). "Identification of the PP2A-interacting region of heat shock transcription factor 2." *Cell Stress Chaperones* **12**(2): 192-197.
131. Yaar, M. and B. A. Gilchrest (1998). "Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors." *J Invest Dermatol Symp Proc* **3**(1): 47-51.
132. Yamamoto, M., Y. Suzuki, H. Kihira, H. Miwa, K. Kita, M. Nagao, S. Tamura, H. Shiku and M. Nishikawa (1999). "Expressions of four major protein Ser/Thr phosphatases in human primary leukemic cells." *Leukemia* **13**(4): 595-600.
133. Yan, Y. and M. C. Mumby (1999). "Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases." *J Biol Chem* **274**(45): 31917-31924.
134. Zarkowska, T. and S. Mittnacht (1997). "Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases." *J Biol Chem* **272**(19): 12738-12746.
135. Zlatanova, J. and K. Van Holde (1992). "Histone H1 and transcription: still an enigma?" *J Cell Sci* **103** (Pt 4): 889-895.

TÁRGYSZAVAK

Daunorubicin (DNR)

Keratin 1/10

Keratinocita sejtek (HaCaT)

PKC által foszforilált PP1 inhibitor fehérje (KEPI)

Protein foszfatáz-1, -2A

Retinoblasztóma fehérje (pRb)

THP-1 humán akut leukémia monocita sejtek

UV sugárzás

Daunorubicin (DNR)

Keratin 1/10

Keratinocyte (HaCaT)

Kinase-enhanced protein inhibitor (KEPI) of protein phosphatase-1

Protein phosphatase-1 and -2A

Rtinoblastoma protein (pRb)

THP-1 leukemic cells

UV irradiation

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Erdődi Ferenc egyetemi tanárnak, aki TDK, illetve Ph.D. hallgatóként eltöltött éveim alatt segítette és támogatta munkámat.

Köszönöm Dr. Gergely Pál egykori, és Dr. Virág László jelenlegi intézetvezetőnek, hogy munkámat támogatták és lehetővé tették számomra a kiemelkedő kutatási feltételeket a Debreceni Egyetem ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében.

Köszönöm munkacsoportunk minden tagjának, Dr. Lontay Beátának, akitől elméleti és szakmai segítséget kaptam munkám során, Dr. Kiss Andreának, akitől már TDK hallgatóként számos módszert elsajátítottam, Sipos Adriennek, akivel számtalanszor kisegítettük egymást, Bécsi Bálintnak és Bátorfi Róbertnek, akikkel együtt kezdtünk és bírkóztunk meg az eltelt évekkel, és Tóth Emesének, aki az elmúlt egy évben támogatott. Köszönettel tartozom Dr. Németh Árpádnének és Docsa Andreának, akik a segítségnyújtás mellett vidámságot hoztak a mindennapokba.

Hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akiknek szeretetüket és türelmüket mindvégig magaménak tudhattam.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 számú projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, TAMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019, TAMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019 Derminova, PD OTKA 104878 , OTKA PD 111715, OTKA K109249 illetve a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt nyújtott támogatást. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/422/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dedinszki Dóra
Neptun kód: QSB320
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10034522

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dedinszki, D.**, Sipos, A., Kiss, A., Bátori, R., Kónya, Z., Virág, L., Erdődi, F., Lontay, B.: Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin.
Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis. 1852 (1), 22-33, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.005>
IF:5.089 (2013)
2. **Dedinszki, D.**, Kiss, A., Márkász, L., Márton, A., Tóth, E., Székely, L., Erdődi, F.: Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs.
Cell. Signal. Epub ahead of print (2014)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.021>
IF:4.471 (2013)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. □ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 45. □ Tel.: (52) 518-600
E-mail publikaciok@lib.unideb.hu □ Honlap: lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Bécsi, B., **Dedinszki, D.**, Gyémánt, G., Máthé, C., Vasas, G., Lontay, B., Erdódi, F.: Identification of protein phosphatase interacting proteins from normal and UVA-irradiated HaCaT cell lysates by surface plasmon resonance based binding technique using biotin-microcystin-LR as phosphatase capturing molecule.
J. Photochem. Photobiol. B. 138C, 240-248, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.004>
IF:2.803 (2013)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,363

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,56

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

Debrecen, 2014. 12.09.



Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások:

Dedinszki D.: Regulatory functions of Protein phosphatase-1 inhibitor toxins and inhibitor proteins. Signaling pathways in cancer biology, Training course, Mátraháza, 2014.

Dedinszki D.: The role of protein phosphatase 1 in UV sensitivity. Signaling pathways in cancer biology, Training course, Egerszalók, 2013.

Dedinszki D., Sipos A., Bátori R., Kiss A., Erdődi F., Lontay B.: A protein foszfatáz 1 szerepe a keratinociták UV érzékenységében. MBKE Jelátviteli Szakosztály III. Konferenciája, Esztergom, 2012

Dedinszki D.: The role of inhibitor toxins and phosphorylatable inhibitory proteins of protein phosphatase-1 in the mediation of retinoblastoma protein phosphorylation. Signal transduction and skin biology, Training course, Galyatető, 2011.

Dedinszki D.: The role of phosphorylatable inhibitor proteins of protein phosphatase-1 in the survival of malignant cells. Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia, Debrecen, 2010.

Dedinszki D.: Foszforilálható PP1 gátló fehérjék azonosítása THP-1 leukémiás sejtekben. Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Ph.D. konferencia, Debrecen, 2009.

Poszterek:

Dedinszki D., Sipos A., Bátori R., Kiss A., Erdődi F., Lontay B.: A protein foszfatáz-1 szerepe a keratinociták UV érzékenységében. 42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012.

Dedinszki D., Kiss A., Gergely P., Erdődi F.: Protein foszfatáz-1 gátló toxinok és foszforilálható gátló fehérjék hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára. MBKE 2011. Vándorgyűlés, Pécs, 2011.

Dedinszki, D., Kiss, A., Erdődi, F.: The role of inhibitor toxins and phosphorylatable inhibitory proteins of protein phosphatase-1 in the mediation of retinoblastoma protein phosphorylation. Europhosphatases, Baden, Austria, 2011.

Dedinszki D., Kiss A., Erdődi F.: A foszforilálható protein foszfatáz-1 (PP1) gátlófehérjéinek szerepe a daganatos sejtek túlélésében. Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi vándorgyűlése, Budapest, 2010.

Dedinszki D., Kiss A., Erdődi F.: Foszforilálható PP1 gátló fehérjék azonosítása THP-1 leukémiás sejtekben. 39. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2009.

Dedinszki D., Márton A., Kiss A., Bécsi B., Márkász L., Oláh É., Erdődi F.: Foszfátáztató fehérjék és toxinok szerepe a leukémiás sejtek életképességének fenntartásában. Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése, Szeged, 2008.