

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

Protein foszfatázok szabályozó szerepe leukémiás sejtek kemoszenzitivitásában és keratinociták patológiás folyamataiban

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

Írta: Dedinszki Dóra okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Balajthy Zoltán, PhD

Dr. Balla András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Élettani Intézet könyvtára
2015. február 17. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Apáti Ágota, PhD

Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD

Dr. Balajthy Zoltán, PhD

Dr. Balla András, PhD

Dr. Dóczy-Bodnár Andrea, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2015. február 17. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A fehérjék posztranszlációs módosításának gyakran vizsgált lehetősége a reverzibilis kovalens módosítások közé tartozó foszforiláció, amelyet protein kináz és foszfatáz enzimek szabályoznak. Az eukarióta sejtekben a szerin/treonin (Ser/Thr) oldalláncok módosítása a leggyakoribb (az összes foszforiláció több mint 90 %-a), amelyet specifikus protein kinázok és foszfatázok katalizálnak. Napjainkban már elfogadott tény, hogy a fehérje foszforiláció mértékének kialakításában a protein kinázok és foszfatázok szabályozásának is alapvető szerepe van. Mindezen felismerések az utóbbi években a protein foszfatázok sejt folyamatok szabályozó szerepére irányították a figyelmet, és ezek közül a foszfo-Ser/Thr specifikus defoszforiláció több mint 90 %-áért felelős protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek kerültek a kutatások előterébe.

A PP1 és PP2A szerkezete és szabályozása

A PP2A fehérjéknek kitüntetett szerepük van a sejtosztódásban és sejthalálban, a sejtciklus szabályozásában, a citoskeleton dinamikájában, számtalan jelátviteli útvonalban, de azonosították, mint tumor szupresszort is. A PP2A alap szerkezeti egysége egy dimer molekula, amely 36 kDa katalitikus „C” alegységből (PP2A_c), és 65 kDa „A” regulátor alegységből (PR65) áll. Ez a két alegység együttesen az enzim alapvázát (core enzyme) alkotja, és ehhez kapcsolódhatnak még a „B” alegység különböző változatai, amelyek így a trimer PP2A holoenzimet hozza létre. 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.

A PP1 az összes eukarióta sejtben megtalálható, részt vesz a sejtosztódás, apoptózis, fehérje szintézis, metabolizmus, citoskeletális szerveződés és membrán receptorok működésének szabályozásában, ami a fehérje jelentős szerepére utal az

élővilágban. A sejtekben a PP1 holoenzim formában fordul elő, amelyekben a PP1 katalitikus alegység (PP1c) egy regulátor alegységhez kapcsolódik. 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), amelyet általánosan RVxF motívumként adnak meg. Az emlősökben a 35-38 kDa méretű PP1c három PP1 gén terméke, amelyek öt izoformát kódolnak (PP1 α_1 , PP1 α_2 , PP1 δ , PP1 γ_1 , PP1 γ_2). A PP1c N-terminális doménjának Y-alakú árkainak kereszteződésében helyezkedik el az aktív centrum, amelyben két fémion, Mn²⁺ és a Fe²⁺ található, és koordinációjukban három hisztidin, két aszparginsav és egy aszparagin vesz részt. Az aktív centrumban található fémionok egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén segítik elő a szubsztrát foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét.

A PP1 és PP2A enzimek gátlására a természetben előforduló, mikroorganizmusok által termelt membránpermeábilis toxinok (mikrocisztin-LR, kantaridin, okadánsav, kalikulin-A, tautomycin) 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. Megakadályozzák a foszfo-szubsztrát hidrolízisét és kötődését azzal, hogy az aktív centrumban található fémionokkal lépnek kapcsolatba, és a hidrofób árokba kötődve lefedik a katalitikus centrum szubsztrátkötő zsebének egy részét.

A természetes toxinokon kívül a PP1 enzimek aktivitásának szabályozásában hőstabil, kis molekulatömegű (14-32 kDa) fehérjék is részt vesznek, mint pl. inhibitor-1, inhibitor-2, DARPP-32, CPI-17, PHI-1 és az általunk is vizsgált, KEPI. A KEPI fehérje gátló hatása a többi inhibitorokhoz (inhibitor-1, DARPP-32, CPI-17, PHI-1) hasonlóan foszforiláció függő, és gátló hatását a Thr73 oldalláncán PKC vagy ILK kinázok által történő foszforilációja után fejti ki. Mivel a KEPI a CPI-17 fehérjecsaldába tartozik, így szekvenciájuk nagyfokú hasonlóságot mutat a gátló hatásért felelős treonin aminosav környékén (CPI-17: A³⁵RVTVKYDRKE⁴⁵; KEPI:

G⁷⁰KVTVKYDRKE⁸⁰), azonban e fehérjék N- és C-terminális doménjei igen variábilisak az egyes családtagok között. A legnagyobb különbséget a PP1c kötő motívum megléte adja, ami a CPI-17 fehérjén kívül a többi fehérje N-terminális szakaszán megtalálható, ezáltal pl. a KEPI foszforilálatlan formában is kötődik a PP1c-hez.

Korábban kimutatták, hogy a PP1c-ből és a miozinhoz is kötődő regulátor alegységből (MYPT1) álló miozin foszfatáz (MP) holoenzim defoszforilálja, és ezzel befolyásolhatja a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációs állapotát leukémiás sejtekben, 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) szerkezete és funkciója

A sejtek osztódásakor a ciklin-függő kinázok és partnereik a ciklinek a fehérjék foszforilációjával szabályozzák a sejtciklus G₁/S és G₂/M átmeneteit. 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 végbemeneteléséhez, hiszen 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, illetve a túlélés/apoptózis egyensúlyának fenntartásában is. A pRb fehérjének a partnerekhez (E2F1, LxCxE motívumot tartalmazó fehérjék) való kötődését a foszforilációs állapota is befolyásolja. A pRb alulfoszforilált állapotban köti az E2F1 transzkripciós faktort, míg hiperfoszforilált állapotban az E2F1 disszociál a pRb-ről. 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. Egyes aminosavak foszforilációjának kitüntetett szerepe van az E2F1 transzkripciós faktor

felszabadításában, azaz 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. A defoszforilációt PP1 és PP2A enzimek egyaránt katalizálhatják. A PP2A a ciklin-függő kinázok aktivitásának csökkentése révén közvetett módon járul hozzá a pRb foszforilációs szintjének csökkenéséhez. Annak ellenére, hogy valamennyi PP1c izoforma részt vehet a defoszforilációban, feltételezhető, hogy a PP1c izoformák holoenzimként, amint ezt a MP szerepe is példázza, szabályozzák a pRb defoszforilációját. A munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a MP defoszforilálja a pRb Thr826 oldalláncát, és mivel a PP1c-t tartalmazó holoenzimek aktivitásának szabályozása akár inhibitor toxinokon, akár inhibitor fehérjéken keresztül is történhet, így célunk volt a KEPI inhibitor fehérje lehetséges pRb foszforilációt szabályozó szerepének feltárása.

Az ultraibolya sugárzás hatása a bőr daganatos megbetegedéseiben

Az UV sugárzás, UVA, UVB és UVC tartományra bontható fel. 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. A legnagyobb károsodást az UVC sugárzás okozná, azonban a Föld légköre szinte teljesen kiszűri. Az UVA és UVB biológiai hatása eltér, mivel az UVA főleg reaktív oxigén gyökök (ROS) felszabadításával és kisebb mértékű DNS károsító hatásaival eredményez apoptózist, addig az UVB sugárzás főleg DNS töréseket, pirimidin dimereket és fototermékeket hoz létre.

A hámiban megtalálható melanociták melanoszómái által termelt melanin kezdetben védelmet biztosít, illetve képes csökkenteni az UV sugárzás káros hatásait. Védő szerepe van szintén az ektodermális eredetű keratinocita sejteknek, amelyek a hám sejteinek 90 %-át alkotják. Elszarusodnak, keratin filamentumokat termelnek,

ezzel egy barriert alakítanak ki, ami véd az UV sugárzások káros hatásai ellen, emellett megakadályozza a vízvesztést és védelmet nyújt a fertőzésekkel szemben is. Az UV indukált védekezésben a keratinociták által termelt 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), amelyek a receptoraikhoz kötődve aktiválják a MAPK/ERK és PI3K/AKT útvonalakat, és az apoptózis kivédésében, illetve a túlélés elősegítésében van szerepük. Ezen útvonalak szabályozásában is elengedhetetlen a protein foszfatázok szerepe. 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 differenciációjában, ezzel szemben azonban a PP1 szerepe még kevésbé tanulmányozott. Munkánk során betekintést kívántunk nyerni a PP1c szerepére a bőr UVA által indukált patológiás folyamataiban.

CÉLKITŰZÉSEK

Számos vizsgálat irányul arra, hogy a fehérjék foszforilációja hogyan befolyásolja a különböző szervezetben és sejtekben kialakuló patológiás folyamatokat, illetve a sejtek túlélése és apoptózisa közti egyensúlyt. Az még azonban nem minden részletében tisztázott, hogy mely protein foszfatázok vesznek részt e folyamatokat szabályozó fehérjék defoszforilálásában. 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, így a PP1 gátlása hatással van a 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. Ismert az is, hogy az UV sugárzás által indukált DNS károsodás szabályozásában, és a keratinocitákat érintő patológiás folyamatokban is szerepe van a protein foszfatázoknak, és e tekintetben a PP1 szerepe még nem minden részletében tisztázott.

A fentiek 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

Sejtek tenyésztése, kezelése és lízise

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 és HaCaT keratinocita sejteket DMEM oldatban tartottuk, amelyek 10 % FBS-t és 2 mM L-glutamint tartalmaztak. Az NHEK normál humán epidermális keratinocita sejteket EpiLife oldatban tartottuk, amely 10 % FBS-t Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) oldatot, 100 µg/ml streptomicint, 100 IU/ml penicillint és 10 ng/ml amphotericin B-t tartalmazott. A sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5 % CO₂ és 95 % levegő vízgőzzel telített keverékében történt.

THP-1 és KG-1 sejtek esetében a kezeléseket megelőzően 5x10⁶/ml sejtet szérummentes médiumban éhezettettük 16 órán át, majd 50 nM CLA-val (1 óra), 1 µM TM-el (1 óra) vagy 1 µg/ml DNR -rel (6 óra) kezeltük. 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.

Az MCF-7 sejteket FLAG-KEPI-vel való transzfekció után 16 órán keresztül szérummentes médiumban éhezettettük, majd 50 nM CLA-val (1 óra) vagy 100 nM PMA-val (30 perc) kezeltük, majd PBS-sel mostuk.

A THP-1 és MCF-7 sejtekhez 100 µl RIPA 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 a PBS-sel történő mosás után, 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.

NHEK és HaCaT sejtek esetében siPP1c csendesítést követően, illetve TM kezelést megelőzően a sejteket 16 órán keresztül szérummentes médiumban éhezettük, majd 10 J/cm² UVA-val besugároztuk. 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-merkaptoetanolt 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* gyógyszer-érzékenységi teszt

A gyógyszer-érzékenységi vizsgálatokat 2 napos sejtenyészeteken végeztük 384-lyukú lemezeken. Minden lyuk 1000 sejtet tartalmazott 30 µl érfogatban. 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 tápfolyadékban lévő sejteket tartalmazott, amelyekhez 50 nl DMSO-t adtunk, illetve 5 lyuk csak tápfolyadékban lévő sejteket tartalmazott médium 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 lézer fluoreszcens konfokális mikroszkópot alkalmaztunk. Az élő sejtek számát Count 3.0 programmal határoztuk meg QuantCapture 4.0 program segítségével készült képeken. A programokat OpenLab (Improvision) háttérrel felhasználva a KIVIF-ben fejlesztették ki. Az átlag túlélést három lyuk átlagából határoztuk meg.

Western blot

A fehérjéket denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blotoltuk. Inert fehérjékkel történő blokkolást követően a membránokat először primer, majd HRP-konjugált szekunder antitesttel inkubáltuk, és az immunreakciókat ECL reagenssel detektáltuk.

Kaspáz-3 aktivitás mérés

A kaspáz-3 aktivitást egy DEVD-AMC konjugátumból történő AMC felszabadulással mértük fluorometriás módszerrel. Kezelést követően a THP-1 sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd jéghideg PBS-sel történő mosás után 1100 µl lízis pufferben (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) lízáljuk. A lízátumot centrifugáltuk és a felülúszóhoz 1000 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, és a felszabaduló AMC mennyiségét 360 nm-es excitációs és 460 nm-es emissziós hullámhosszak mellett határoztuk meg.

Életképes, apoptotikus és nekrotikus sejtek detektálása Hoechst festékkel és LDH felszabadulás mérésével

A kezeléseket követően a THP-1 sejteket háromszor mostuk PBS-el. PBS-ben hígított 10 µM Hoechst 33342 festékkel 15 percig, majd 5 µM propídium joddal (PI) 5 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on, sötétben. A morfológiai vizsgálatokhoz a sejteket poli-L-lizinnel fedett fedőlemezekre helyeztük. A felvételeket Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) készítettük. A sejtek állapotának meghatározásakor “életképesnek” tekintettük a Hoechst pozitív/PI negatív, normal 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 nekrotikus sejtek meghatározására Cytoscan colorimetric assay-vel (Roche Applied Science, Budaörs, Magyarország) mértük a sérült sejtekből felszabaduló laktát dehidrogenáz (LDH) mennyiségét a gyártó utasításainak megfelelően. Az egyes kezelések esetében a citotoxicitást a maximális LDH %-ban adtuk meg.

Életképesség vizsgálata Metil-tiazol-tetrazólium (MTT) teszttel

Kezeléseket követően a sejtekhez metil-tiazol-tetrazólium (MTT)-reagenst adtunk, amit az élő sejtek színes formazánná alakítottak. 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 sejtizátumok foszfatáz aktivitásának meghatározásához ^{32}P -al jelölt miozin könnyű láncot (^{32}P -MLC20) használtunk szubsztrátként. A mintákat 5 percig inkubáltuk 30 °C-on inhibitor-2 (I-2) jelenlétében illetve távollétében. A szubsztrátból felszabaduló $^{32}\text{P}_i$ -t a fehérjék triklór-ecetsavval történő kicsapását és centrifugálást követően a felülúszóból határoztuk meg.

FLAG-KEPI és panPP1c siRNS transzfekció

Az MCF-7 sejtek transzfekcióját és a HeLa és HaCaT sejtek csendesítését tisztított FLAG-KEPI plazmid vagy panPP1c siRNS felhasználásával szérummentes médiumban végeztük. A transzfekcióhoz szüksége Gene Juice transzfekciós reagenst (6 μl /lyuk) és FLAG-KEPI plazmidot (2 μg /lyuk) tartalmazó premixet vagy a csendesítéshez szükséges DharmaFECT 2 transzfekciós reagenst (10 μl) és panPP1 siRNS-t (100 nM végkoncentráció) tartalmazó premixet cseppenként hozzáadtuk a

sejtekhez és 30 percig inkubáltuk szuszpenzióban, majd megegyező térfogatú 20 % FBS-t tartalmazó médiumot adtunk a sejtekhez. 24 óra múlva a tápoldatot lecseréltük, ezzel eltávolítva a transzfekció reagenst a sejtekről, és további 24 óráig inkubáltuk a sejteket 10 % FBS-t tartalmazó tápoldatban.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A különböző kezeléseket követően a sejteket PBS-sel 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 fedőlemezeken rögzített sejteket éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl (1:200), Alexa 543-konjugált anti-egér (1:200) szekunder antitesttel vagy Texas Red Phalloidinnel (1:1000) reagáltattuk. 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 Confocal Laser Microscope segítségével detektáltuk.

UVA 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 sejteket 16 óráig szérum mentes DMEM médiumban éhezettük. 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/cm^2 -ben adtuk meg.

Állatkísérletek és immunhisztokémiai vizsgálatok

A kísérleteinkhez 6 hetes, hím, Balb/c (Charles River) egereket használtunk. Minden állatprotokoll az Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (*Institutional Ethics Committee*) (7/2010 DE MÁB) engedélyével és felülvizsgálatával készült. Az egerek hátáról a szőrt kereskedelmi forgalomban kapható Veet szőrtelenítő krémmel távolítottuk el. Kontroll esetén anionos hidrophil krémmel, a kezelés során anionos hidrophil krémbe oldott tautomicinnel (1 μM) kezeltük az egerek bőrét, majd UVA-val besugároztuk. Az UVA sugárzáshoz Philips TL-20W/12 lámpával (Philips, Eindhoven, Hollandia) felszerelt készüléket használtunk, ami 315-400 nm hullámhosszúságú sugárzást bocsájtott ki. 5 napon át, napi háromszor sugároztuk az egereket 5 J/cm^2 UVA fénnel. Cervikális diszlokációt követően a kontroll és kezelt egérbőr minták felét azonnal 10 %-os neutrális puffertelt formalinban fixáltuk, amit hematoxilin és eosin (H&E) festés követett. Keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b fehérjék immunhisztokémiai vizsgálatához a metszeteket az adott fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Mosási lépést követően a mintákat tormaperoxidázzal kapcsolt anti-egér vagy anti-nyúl antitestekkel reagáltattuk, és 3,3'-diaminobenzidin-nikkel (DAB-nikkel) színreakcióval tettük láthatóvá az általunk vizsgált fehérjék lokalizációját illetve mennyiségét. A bőrminták másik felét a szövet homogenizálását követően Western blot analízisre használtuk fel.

RNS és microarray analízis adatok elemzése

Kontroll HaCaT, panPP1c csendesített, UVA besugározott és kombinált kezelésen (panPP1c csendesítés, UVA besugárzás) átesett HaCaT sejtekből RNS izolálást végeztünk, amelyhez Trizol reagent használtunk. 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. Az adatok feldolgozását GeneChip Scanner 7G (Affymetrix) segítségével

végeztük. Az RNS jelölést és hibridizálást az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd (Debrecen) végezte. A microarray adatok elemzése GeneSpring 12 GX software-rel (Agilent BioTechnologies) történt.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

PP1 és PP2A szerepe a sejtek életképességének szabályozásában

Korábban már tanulmányozták a PP2A szelektivitást mutató kalikulin-A (CLA) membránpermeabilis toxin hatását leukémiás sejtek életképességére, ami kemoterápiás szerekkel (citozin arabinozid, etopozid, daunorubicin) együtt alkalmazva elősegítette a túlélést. E folyamatok molekuláris hátterét tanulmányoztuk, illetve vizsgálni kívántuk a PP1 szelektivitást mutató tautomycin (TM) szerepét is daunorubicinnel (DNR) kiváltott sejthalálban. Kísérleteink során a PP2A-t gátló CLA és a PP1-t gátló TM önmagában alkalmazva kismértékű sejtpusztulást eredményezett THP-1 és KG-1 leukémiás sejtekben egyaránt, azonban a két toxinnal történő előkezelés a DNR hatását mérsékelte. Az apoptózis egyik korai jeleként DNR jelenlétében kaszpáz-3 aktivitás növekedést detektáltunk, amelyet a CLA előkezelés csökkentett, míg a TM-el történő előinkubáció nem befolyásolt. Irodalmi adatokból ismert, hogy a DNR hatására defoszforilálódik és degradálódik a pRb, valamint kimutatták azt is, hogy a CLA kezelés a pRb foszforilációját és csökkent degradációt eredményez, ami megnövekedett túléléshez vezet. Eredményeink szerint a PP1 és a PP2A gátlás is növeli a pRb foszforilációjának mértékét, amely mérsékelheti a DNR-nek a G1→S átmenetre kifejtett gátló hatását. Egyéb, túlélés szabályozásában részt vevő fehérjék (Erk1/2, Akt) vizsgálata során kimutattuk, hogy ezek foszforilációs szintjét (Erk1/2^{pT202/pY204} és Akt^{pT473}) csak a CLA növelte, a TM kezelés/előkezelés hatástalannak bizonyult. Mindezen adatokból arra következtetünk, hogy a PP1 és PP2A különböző jelátviteli útvonalakon keresztül szabályozza a DNR által indukált apoptózist, és a leukémiás sejtek terápiás szerek iránti kemoszenzitivitását, azonban e folyamat mindkét enzim által befolyásolt közös eseményének tűnik a pRb foszforilációs szintjének szabályozása.

KEPI inhibitor fehérje hatása a retinoblasztóma fehérje foszforilációjára

A pRb Thr826 aminosav oldalláncának defoszforilációját PP1c izoformák végzik, de ezek a sejtekben a feltételezések szerint holoenzimként, regulátor alegységhez kapcsolódva vannak jelen. A regulátor alegységek pRb-t defoszforiláló hatása eltérő lehet: a PNUTS regulátor alegység csökkenti, a MP MYPT1 alegysége viszont növeli a PP1c aktivitást a foszfo-pRb iránt. Mivel a MP aktivitását a MYPT1 regulátor alegység gátló helyeinek (Thr696 és Thr853) foszforilációja, illetve foszforiláció függő inhibitor fehérjék (pl. CPI-17, KEPI) befolyásolhatják, így megvizsgáltuk, hogy a CLA és TM kezelés hogyan befolyásolja ezeket a foszforilációs folyamatokat. CLA kezelés hatására megnőtt a MYPT1 gátló helyek (MYPT1^{pT696}, MYPT1^{pT853}), és a THP-1 sejtekben azonosított KEPI fehérje gátló aminosav (KEPI^{pT73}) oldalláncának foszforilációja, azonban TM-el történő kezelés során nem tapasztaltunk foszforilációs szint emelkedését az említett aminosav oldalláncokon. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PP1c nem „autodefoszforilálja” a MYPT1 gátló foszforilációs helyeit és nem defoszforilálja a KEPI fehérje foszforilált gátló aminosav oldalláncát sem. 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, valamint a jelen THP-1 és HeLa sejteken (PP1c csendesítés) végzett kísérletek tehát egyértelműen bizonyították a PP1 szerepét a pRb Thr826 aminosav oldalláncának defoszforilálásában.

A KEPI fehérje foszforilációját a gátló Thr73 oldalláncan a PKC is katalizálja, ezért a PKC aktiválására PMA kezelést alkalmaztunk, ami a foszforilált KEPI szintjének emelkedését eredményezte. A foszforiláció által aktivált overexpresszált KEPI MCF-7 sejtekben (amelyek nem tartalmaznak endogén KEPI fehérjét) a citoszólból a sejtmagba transzlokálódott, ami növelte a sejtmagban lokalizálódó pRb foszforilációjának mértékét a Thr826 aminosav oldalláncan.

Mindezek további bizonyítékot szolgálnak a PP1 gátlás pRb szabályozásában betöltött szerepére.

CLA általi foszforiláció indukciót a KEPI-t expresszázó MCF-7 sejtekben is megismételtük. Igazoltuk, hogy a PP2A-nak szerepe van a KEPI Thr73 gátló hely foszforilációjának szabályozásában, hiszen CLA kezelés hatására megnövekedett a Flag-KEPI transzfektált MCF-7 sejtekben a KEPI^{pT73} foszforilációs szint. A CLA kezelés nem transzfektált, azaz KEPI fehérjét nem tartalmazó MCF-7 sejtekben is pRb^{pT826} foszforilációs szint emelkedést eredményezett, ez azonban feltehetően más folyamatoknak (CLA növeli a MYPT1 foszforiláló kinázok működését és/vagy gátolja a defoszforilációt végző foszfatázok aktivitását) a következménye. A KEPI fehérje transzfekciója már önmagában pRb^{pT826} foszforilációs növekedéshez vezetett, ami még kifejezettebbé vált, ha a KEPI-t CLA-val aktiváltuk.

A fenti adatokból arra is következtethetünk, 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 van közvetlen szerepe. A PP2A a pRb defoszforilációját közvetett úton szabályozza, feltehetően a MP MYPT1 alegységének és a KEPI inhibitor fehérje defoszforilációjának befolyásolásával.

PP1c gátlás 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. A P-Ser/Thr specifikus protein foszfatázok közül a PP2A és PP2B szerepét részletesebben vizsgálták az UV sugárzás indukálta apoptózisban, az epidermisz barrier funkciójának kialakításában és az epidermisz

differentiációban, azonban a PP1 szerepe a keratinociták homeosztázisában még kevésbé tanulmányozott.

HaCaT sejtek szubcelluláris frakcióinak Western blotlalt, immunfluoreszcenciával és foszfatáz aktivitás mérésével történő vizsgálatából arra következtettünk, hogy a PP1 α/γ elsősorban a citoplazmában, és viszonylag kisebb mennyiségben található a sejtmagban. Ezzel szemben a PP1 δ izoforma a sejtmagban és a citoplazmában is nagyobb mennyiségben lokalizálódik, így feltehetően a sejtmagban ez az izoforma befolyásolja a génexpressziós változásokat.

UVA sugárzás a foszfatázok (PP1 és PP2A) enzimaktivitásának és a HaCaT sejtek életképességének csökkenését okozta. Az életképesség és foszfatáz aktivitás vizsgálatainkban alkalmazott dózisosok, valamint irodalmi adatok szerint a normál napi UVA dózis (~10-18 J/cm²) alapján kísérletekben 10 J/cm² UVA besugárzás dózist alkalmaztunk. 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. Irodalmi adatok alapján az UVA sugárzás reaktív oxigén gyökök keletkezését indukálja és ezek a PP1 és PP2A enzimek katalitikus centrumában található aminosavak és fémionok oxidálásával a foszfatáz aktivitás gátlását is okozhatják. 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. A PP1c izoformák 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 morfológiai állapotának kialakításában. Kitüntetett figyelmet fordítottunk egyes fehérjék, így a keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b génexpressziós változásaira, mivel ezek a fehérjék melanóma markerekként is ismertek. A tapasztal génexpressziós változások fehérje szinten 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.

PP1 gátlás és UVA besugárzás hatásának vizsgálata Balb/c egerek bőrén

Balb/c egérm modellen a PP1 szerepének tanulmányozására TM inhibitort használtunk és az egyedek bőrfelületét összesen 531 J/cm^2 UVA dózissal sugároztuk be, ami megközelíti a minimális eritéma, azaz bőrpírt okozó UVA dózist (510 J/cm^2). A szövettani vizsgálatainkból kiderült, hogy az UVA sugárzásnak, a TM kezelésnek vagy a két kezelés kombinációjának kitett bőr esetében elsősorban az epidermisz az epidermális szövetszaporulat (epidermal hyperplasia) tüneteként megvastagodott, de gyulladásos elváltozásokat nem mutatott. A kezelt bőrfelületek másik feléből Western blot analízissel vizsgáltuk, hogy a HaCaT sejtekben változó expressziót mutató fehérjék (keratin 1, keratin 10, S100A8 és hiszton 1b) expressziós szintje változik-e egér bőrben is a kezelések következményeként. A kontroll, kezeletlen bőrfelületekhez képest a TM-el kezelt, azaz PP1 gátolt mintákban megnövekedett a keratin 1, keratin 10 és S100A8 fehérjék mennyisége, amelyek szintje fokozódott a bőrfelületek UVA besugárzását, vagy a két kezelés kombinációját követően is. A hiszton 1b esetében a keratinocitákkal végzett kísérletekkel ugyancsak megegyező irányú, de nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. A HaCaT keratinocitákon és Balb/c egereken végzett kísérletek eredményeiből megerősítést nyertünk arra nézve, hogy a bőr egészséges homeosztázisának fenntartásában a PP1 típusú enzimeknek kitüntetett szerepe van. Mindezek az eredmények arra irányítják a figyelmet, hogy a protein

foszfátáz enzimek új terápiás célpontokká válhatnak, akár a bőr daganatos megbetegedéseinek kezelése során is.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. 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 enzim gátlása fokozza a pRb foszforilációját és ezzel elősegíthetik a sejtciklus G1→S átmenet DNR ált al történő gátlásának részleges feloldását.
2. PP1 katalitikus alegység (PP1c) csendesítési kísérletek, valamint a PP1 inhibitor KEPI fehérje expressziója és foszforilációjának indukálása arra utaltak, hogy a pRb defoszforilációját közvetlenül PP1 katalizálja, a PP2A pedig a PP1 inhibitor fehérjék foszforilációján keresztül szabályozza a pRb foszforilációjának mértékét.
3. 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 HaCaT keratinocita sejteken és egerek bőrének PP1 gátlással (siPP1c vagy TM kezelés), UVA besugárzással és ezek kombinációjával történő kezelése során is.



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)





További Közlemények

3. Bécsi, B., **Dedinszki, D.**, Gyémánt, G., Máthé, C., Vasas, G., Lontay, B., Erdődi, 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 tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.12.09.



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, OTKA PD 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.



The projects have been supported
by the European Union.