

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Protein foszfatáz-1 szabályozása
a regulátor alegység foszforilációjával és
katalitikus alegységhez kötődő inhibitorokkal**

Kiss Andrea

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc



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

2008

BEVEZETÉS

A fehérjék foszforilációja és defoszforilációja a sejtfolyamatok szabályozásának egyik fontos mechanizmusa. A protein kinázok a fehérjék foszforilációját katalizálják, a foszforiláció reverzibilitását a protein foszfatázok biztosítják. A foszfo-serin/treonin (Ser/Thr) specifikus foszfatázok közül kitüntetett szerepe van a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimeknek, amelyek egyes becslések szerint az összes foszfo-Ser/Thr specifikus defoszforiláció mintegy 90 %-áért felelősek.

Protein foszfatáz-1 holoenzimek szerkezete és szabályozása

A sejtekben a PP1 holoenzim formában fordul elő, amelyekben a PP1 katalitikus alegység (PP1c) regulátor alegységhez kapcsolódik. A PP1c valamennyi eukarióta szervezetben és eddig vizsgált sejttypusban expresszálódik, és több izoformája (PP1 α , γ és δ) ismert. A PP1c aktív centrumában a szubsztrát megkötéséért az Y-alakú katalitikus árok a felelős. A katalitikus árok három ága C-terminális, hidrofób- és savas-árokra osztható, amelyek közül az utóbbi kettőnek van szerepe a szubsztrátok kötődésében. Az aktív centrum két fémiót (feltételezhetően Fe²⁺ és Zn²⁺) koordinál, amelyek egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén elősegítik a szubsztrátmolekula foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét.

A PP1c katalitikus aktivitását természetes eredetű membránpermeábilis toxinok (mikrocisztin-LR, okadánsav, kalikulin-A, tautomycin, tautomycetin) gátolják. Az enzim hidrofób árkaiba kötődve lefedik a katalitikus centrum egy részét, ezzel megakadályozzák a foszfoszubsztrát kötődését és hidrolízisét. Ezek a toxinok a PP1 mellett a PP2A enzim aktivitását is gátolják. Korábban kimutattuk, hogy a gallotannin is gátolja a PP1 és PP2A enzimek aktivitását, azonban a gátlás mechanizmusa, valamint a tannin alkotórészek és a foszfatázok kölcsönhatásának molekuláris részletei nem ismertek.

A katalitikus alegység önmagában számos fehérje defoszforilációját képes katalizálni. A sejtekben azonban a PP1c nem szabadon, hanem szabályozó alegységekkel holoenzimet alkotva fordul elő. Ezek a „célra irányító” fehérjék a katalitikus alegységhez kapcsolódnak, és azt a szubsztrátfehérjéhez vagy a szubsztrátot tartalmazó szubcelluláris kompartmenthez lokalizálják. A regulátor alegység kötődése a szubsztráthoz elősegítheti a katalitikus alegységnek a katalitikus mechanizmus szempontjából kedvező pozicionálását, azaz szabályozza az enzim szubsztrátspecifitását is. A szabályzó fehérjék szerkezete igen változatos, azonban általában megtalálható bennük egy rövid szekvenciárészlet, az úgynevezett PP1c-kötőmotívum (K/R-x₁-V/I-x₂-F/W), amely specifikus kötődést biztosít a

katalitikus alegységhez. A regulátor alegység reverzibilis foszforilációja, általában másodlagos hírvivő molekulák hatásának közvetítése révén, befolyásolhatja a katalitikus alegységgel történő asszociációját és az enzim aktivitását is. A regulátor alegységek ezen változatos szabályozó funkciói azonban még nem minden részletében ismertek.

A változatos szerkezetű és funkciójú fehérjékkel kialakított kölcsönhatások révén a PP1 számos sejt folyamatot szabályoz, mint például a sejt ciklus, az anyagcsere, a transzkripció, a transláció, a sejt motilitás, idegi folyamatok és a szaporodás. Kísérleteink során a miozin foszfatáz holoenzimet vizsgáltuk, ezért a továbbiakban ennek az enzimnek a szerkezetét és szabályozási lehetőségeit ismertetem.

A miozin foszfatáz szerkezete, funkciója és szabályozása

A miozin foszfatáz holoenzim (MP) heterotrimer, egy 38 kDa protein foszfatáz-1 katalitikus alegységből (PP1c δ), egy 110-130 kDa miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1), valamint egy 20 kDa alegységből (M20) áll. Az M20 alegység funkciója még nem ismert. Az enzim működésének szabályozásában a MYPT1 alegység tölti be a fő szerepet, mivel kölcsönhatást létesít a PP1c δ katalitikus alegység és a szubsztrát molekula között. A PP1c-vel kialakuló kölcsönhatásban a MYPT1 N-terminális régióinak van alapvető szerepe, amelyek közül elsődleges fontosságú a ³⁵KVKF³⁸ kötőmotívum. A PP1c-kötőmotívum kötődését a MYPT1¹⁻²² régió kapcsolódása követi, amely elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ illetve a savas régiót tartalmazó MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ kötődését is. A PP1c δ -MYPT1 komplex kialakulása során a MYPT1 N-terminális szekvenciája olyan pozícióba kerül, hogy mintegy meghosszabbítja a PP1c δ Y-alakú katalitikus centrumának hidrofób árkat, elősegítve ezzel a szubsztrát, például a 20 kDa miozin könnyűlánc (MLC20) kötődését.

A MP-t először izomszövetekben jellemezték és szerepét a kontraktilitás szabályozásában ismerték fel, amely a MLC20 defoszforilációja által valósul meg. A MLC20 foszforilációja az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja, míg a miozin foszfatáz által történő defoszforiláció elernyedést (relaxációt) eredményez.

A MP aktivitás szabályozásában fontos szerepet játszanak a MYPT1 foszforilációs helyei, amelyek közül kiemelkedő jelentőségű a Thr695 gátló foszforilációs hely. Ez az oldallánc a Rho/Rho-kináz (ROK) szignalizációs útvonal aktiválása során ROK által foszforilálódik. Ezzel a ROK a MP aktivitás gátlását okozza, és egyidejűleg a miozint is foszforilálja, így részt vesz a Ca²⁺-tól független kontrakció indukálásában. Kimutatták, hogy a ROK ezen kívül a MYPT1 Thr850 oldallancának foszforilációját is katalizálja. A kezdeti

vizsgálatok azt sugallták, hogy a Thr850 foszforiláció a MYPT1 és miozin közötti kölcsönhatás gyengítése révén befolyásolja az enzim működését. A Thr850 foszforilációnak az enzim aktivitására kifejtett hatását azonban részleteiben még nem tanulmányozták. A MYPT1 oldalláncainak defoszforilációját feltételezhetően a PP2A katalizálja, amely hatékonyabbnak tűnik a foszforilált Thr850 oldallánc defoszforilációjában.

A kezdeti feltételezésekkel ellentétben a MYPT1 nemcsak simaizom sejtekben, hanem nem-izom sejtekben, és csaknem a sejt valamennyi szubcelluláris frakciójában megtalálható. A MP változatos sejtben belüli lokalizációja és nagyszámú fehérjével való kölcsönhatása azt bizonyítja, hogy a foszforilált miozinon kívül más szubsztrátok defoszforilációjában is szerepet játszhat.

A PP1 és a MP lehetséges szerepe a sejtciklus szabályozásában

A sejtmagban található retinoblasztóma fehérje (pRb) a tumorszupresszor retinoblasztóma gén terméke, a sejtciklus szabályozásának egyik központi eleme. A pRb hipofoszforilált állapotban az E2F és más transzkripciós faktorokhoz kötődik, és ezzel gátolja azoknak a géneknek az expresszióját, amelyek fehérje termékei fontosak a sejtciklus S-fázisba történő átmenetéhez. Az extracelluláris szignálok hatására hiperfoszforilálódott pRb transzkripciós faktorokkal alkotott komplexei felbomlanak, ami lehetővé teszi a G1/S átmenetet. A pRb foszforilációját a ciklin-függő kinázok katalizálják, míg membránpermeábilis foszfatáz inhibitorokkal végzett kísérletek a PP1 és PP2A enzimek szerepét feltételezik a defoszforilációban. A PP2A közvetett módon járul hozzá a pRb szabályozásához, gátlása a ciklin-függő kinázok aktivitásának csökkentése révén befolyásolja a pRb foszforilációs szintjét. A PP1c és a pRb kölcsönhatására, és a pRb több oldalláncának PP1c általi defoszforilációjára vonatkozóan számos adat van. A PP1c-t a pRb-hez irányító regulátor alegységet azonban még nem azonosították. A pRb főképp a sejtmagban lokalizálódik, így a PP1c-vel kölcsönható partnerként olyan fehérjék merülhetnek fel, mint a nukleáris protein foszfatáz inhibitor (NIPP1) vagy például a PNUTS, a nukleáris foszfatáz regulátor. MYPT1-GFP transzfekciója NIH3T3 sejtekbe a fehérje nukleáris lokalizációját eredményezi, amely a sejtciklus G1/S átmenetének blokkolását, valamint apoptotikus sejtpusztulást indukál, feltételezhetően a pRb fokozott defoszforilációja révén. Ezen eredmények alapján feltételezhető a MP szerepe a pRb foszforilációs szintjének és ezzel a sejtciklus szabályozásában.

CÉLKITŰZÉSEK

A modell enzimként választott MP szabályozását széleskörűen vizsgálták, ennek ellenére a MYPT1 foszforilációs helyek funkciói még nem minden tekintetben tisztázottak. A Thr850 foszforilációs hely környezetének aminosav szekvenciája például hasonló a Thr695 gátló foszforilációs helyhez, ezért felmerül annak a lehetősége, hogy a Thr850 foszforilációja is gátló hatású lehet. A ROK foszforilálja a Thr695 és Thr850 oldalláncokat *in vitro*, azonban simaizom és nem-izom sejtekben a különböző stimulusok során ezen oldalláncokat foszforiláló kinázokról nincs adatunk. Nem ismert továbbá a foszfatázoknak a sejthalálban betöltött szerepe és ezen hatások molekuláris háttere, különösen a regulátor alegység, mint például a MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatásainak tekintetében. Előkísérleteink szerint feltehető, hogy a tannin alkotórészek gátolják a protein foszfatázok aktivitását, azonban ennek molekuláris részletei még nem ismertek.

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

1. A miozin foszfatáz (MP) MYPT1 alegység Thr850 foszforilációs helyének a MP aktivitás szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata. A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncai foszforilációjának tanulmányozása sejtekben foszfatázgátlók jelenlétében és jelátviteli folyamatok aktiválása során.
2. A PP1 és PP2A enzimek gátlásának szerepe a leukémiás sejtek életképességének szabályozásában sejthalált indukáló kemoterápiás szerek jelenlétében.
3. A MP és a pRb kölcsönhatásának vizsgálata és a MP szerepének tanulmányozása a pRb foszforilációs szintjének szabályozásában.
4. A tannin alkotórészek modellvegyületeinek tekinthető epigallokatekin-3-gallát (EGCG) és penta-O-galloil-D-glükóz (PGG) vegyületek PP1c-vel való kölcsönhatásának és a gátló hatás mechanizmusának jellemzése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Fehérjetisztítási eljárások

Miozint és a miozin 20 kDa könnyűláncát pulyka zúzából állítottuk elő, és miozin könnyűlánc kinázzal foszforiláltuk. A miozin foszfatáz holoenzimet csirke zúzából tisztítottuk. A natív PP1c-t nyúl vázizomból izoláltuk. A PP1c és PP2Ac elválasztását heparin-Sepharose kromatográfiával végeztük, majd az elválasztott enzimeket FPLC-MonoQ oszlopon tovább tisztítottuk.

A csirke zúza 133 kDa izoforma szekvenciájának megfelelő MYPT1 (GST-MYPT1), a Thr695Ala (MYPT1^{T695A}), a Thr850Ala (MYPT1^{T850A}) valamint a Ser694Ala, Thr695Ala és Thr850Ala (MYPT1^{AAA}) pontmutációkat tartalmazó teljes MYPT1 és a C-terminális 667-1004 aminosavaknak megfelelő (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) fehérjéket bakteriális expresszióval állítottuk elő, és ioncserés kromatográfiával és/vagy glutation-Sepharose 4B affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A rekombináns His-PP1c δ és a MYPT1 rövidített mutánsait (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1¹⁻⁶³³) a fehérjék végéhez kapcsolt hexahisztidint tartalmazó peptiddel (His) expresszáltuk, és Ni-agaróz affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A His-PP1c δ aktivitását a denaturáló körülmények jelentősen csökkentették, ezért aktív enzim előállításához a kromatográfiát megelőzően a fehérjét Mn²⁺-ionok jelenlétében renaturáltuk és aktiváltuk.

Sejtkultúrák és a sejtek kezelése inhibitorokkal

A kísérletekhez humán patkány aorta simaizom (A7r5) és humán monocita leukémiás (THP-1) sejteket használtunk. Az A7r5 sejteket D-MEM, a THP-1 sejteket IMDM tápoldatban tartottuk, amely 10 % FBS-t tartalmazott. A sejteket a kezelések előtt 16 órán át szérummentes tápoldatban szinkronizáltuk és éhezettük. Az A7r5 sejteket 100 nM CL-A (20 perc), 1 μ M LPA (20 perc) vagy 10 μ M Y27632 (30 perc) effektorokkal inkubáltuk. Kombinált kezelések során a sejteket 30 percig 10 μ M Y27632-val előinkubáltuk a CL-A vagy a LPA kezeléseket megelőzően. A THP-1 sejteket ($\sim 10^6$ /ml) 50 nM CL-A-val kezeltük 60 percig, majd 6 vagy 12 órán át szérummentes médiumban tartottuk. A DNR-rel (2 μ g/ml) történő kezelést 6 vagy 12 óráig alkalmaztuk önmagában vagy CL-A előkezeléssel kombinálva. A tannin alkotórészek hatásának vizsgálatára a sejteket 24 órán keresztül 0-100 μ M PGG-vel vagy EGCG-vel inkubáltuk.

THP-1 sejtek szubcelluláris frakcionálása

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

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.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A foszfatáz aktivitás meghatározását 30°C-on végeztük, 3 μM ^{32}P -miozin, 2 μM ^{32}P -MLC20 vagy 0,5 μM ^{32}P -MBP-pRb-C-t használva szubsztrátként. A foszfatáz mintától függően 0,5-10 perc inkubációs időt alkalmaztunk. A szubsztrátból felszabaduló $^{32}\text{P}_i$ -t a fehérjék triklór-ecetsavval történő kicsapását és centrifugálást követően a felülúszóból határoztuk meg.

Immunprecipitáció és pull-down vizsgálat

Protein-A Sepharose-t inkubáltunk poliklonális anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy monoklonális anti-pRb antitesttel immunprecipitációs pufferben (IP puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 mM PMSF és 0,5 % proteáz inhibitor koktél), majd az elegyet centrifugáltuk. THP-1 sejtek teljes lizátumát Protein-A Sepharose-zal előtisztítottuk, majd az antitestekkel kapcsolt Protein-A Sepharose-zal inkubáltuk. Kontrollként nem-immun nyúl vagy egér szérummal kapcsolt Protein-A Sepharose-t alkalmaztunk. A gyanta szemcséket háromszor IP pufferrel mostuk, majd SDS-mintapufferrel inkubáltuk 100°C-on 5 percig. A pull-down vizsgálatot maltózkötő fehérjével

konjugált C-terminális retinoblasztóma fragmentummal (MBP-pRb-C) végeztük. A THP-1 lizátumot kapcsolatlan amilóz gyantával előtisztítottuk, majd MBP-pRb-C-vel kapcsolt amilóz gyantával inkubáltuk. A fehérjéket SDS-PAGE-el választottuk el és a vizsgált fehérjéket (pRb, MYPT1) immunobloton specifikus antitestekkel azonosítottuk.

Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A különböző effektorokkal történő kezelés után a THP-1 sejteket citospin centrifugával fedőlemezre centrifugáltuk. A lemezeket PBS-sel mostuk, a sejteket 4 % PFA-val fixáltuk, és 0,05 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel permeabilizáltuk, majd 1 % BSA/PBS-sel blokkoltuk. A fixált sejteket 0,1 % BSA/PBS-ben hígított primer antitestekkel, majd Alexa 488-konjugált anti-nyúl vagy Alexa 543-konjugált anti-egér szekunder antitesttel inkubáltuk. A sejtmagok festésére 2,5 µg/ml DAPI-t használtunk. A fedőlemezeket Antifade Light Kit segítségével fedtük le. A sejteket Hélium/Neon, Kripton/Argon és UV lézer detektorokkal felszerelt Zeiss LSM 510 konfokális lézer mikroszkóppal vizsgáltuk.

A sejtek életképességi vizsgálata

A THP-1 sejtekhez (1×10^6 /ml) a kezeléseket követően metil-tiazol-tetrazolium (MTT)-reagenst adtunk, amit az élő sejtek színes formazánná alakítottak. A kialakuló szín intenzitását spektrofotométerrel 562 nm-en mértük. Az optikiai denzitás (OD) mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. A PGG-vel vagy EGCG-vel kezelt THP-1 sejtekhez (1×10^6 /ml) 20 µM végkoncentrációban Alamar Blue-t adtunk, majd a fluoreszcenciát 530/590 nm-en mértük.

Kaspáz-3 aktivitás mérése

A kaspáz-3 aktivitást egy szintetikus szubsztrátból, a DEVD-AMC konjugátumból történő AMC felszabadulással mértük fluorimetriás módszerrel. Kezelések után a THP-1 sejteket PBS-sel mostuk, majd lízis puffer (10 mM Hepes pH 7,4; 2 mM EDTA, 0,1 % CHAPS, 1 mM PMSF, 5 mM DTT and 0,5 % proteáz inhibitor koktél) hozzáadása után 10 percig jégen tartottuk. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 2 µg/ml DEVD-AMC szubsztrátot tartalmazó 2x reakció-puffert (100 mM Hepes (pH 7,25), 20 % szacharóz, 0,1 % CHAPS, 5 mM DTT) adtunk. A mintákat 60 percig 37°C-on inkubáltunk, majd a fluoreszcenciát 355/460 nm-en mértük.

Felületi plazmon rezonancia

A pRb-PP1c, pRb-MYPT1 mutánsok, valamint a PP1c-EGCG és PP1c-PGG kölcsönhatások vizsgálatára felületi plazmon rezonancia (SPR) méréseket végeztünk Biacore 3000 készülékkel. CM5 szenzor chip felületére a fehérjéket anti-GST antitesten keresztül vagy közvetlenül, a fehérjék szabad amino-csoportjainak kapcsolásával immobilizáltuk. A kölcsönható molekulákat különböző koncentrációkban a felszínre injektáltuk. A kötődését az immobilizált fehérjékhez a rezonancia jel (RU) növekedéseként regisztráltuk az idő függvényében, és az így kapott görbéket (szenzogrammok) BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével analizáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncainak foszforilációja és hatása a miozin foszfatáz aktivitásra

Vad típusú (GST-MYPT1) és treonin-alanin pontmutációt (MYPT1^{T695A}, MYPT1^{T850A} és MYPT1^{AAA}) tartalmazó mutáns fehérjék ROK-zal foszforiláltunk, és kimutattuk, hogy a Thr695 és Thr850 oldalláncokat a ROK közel azonos mértékben és azonos sebességgel foszforilálja. A megfelelő oldalláncok foszforilációját anti-MYPT1^{pT695} és anti-MYPT1^{pT850} foszfo-specifikus antitestek alkalmazásával is bizonyítottuk Western blot segítségével.

Tanulmányoztuk a MYPT1 Thr695 és/vagy Thr850 oldalláncon tiofoszforilált formáinak hatását a natív PP1c aktivitására foszforilált miozin és miozin könnyűlánc szubsztrátok alkalmazásával. Eredményeink szerint a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncának foszforilációja egyaránt gátolja a PP1c aktivitását, és ez a gátló hatás az enzim fiziológiás szubsztrátjával, a foszforilált miozinnal is jól detektálható.

A7r5 simaizom sejtekben tanulmányoztuk a RhoA/ROK útvonalat aktiváló lizofoszfatsav (LPA), a ROK inhibitor Y27632, valamint a foszfatázgátló CL-A hatását a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációjára. Kimutattuk, hogy nem kezelt sejtekben a Thr695 és Thr850 oldalláncok részlegesen foszforilált formában vannak jelen. A ROK-ot gátló Y27632 inhibitorral kezelt sejtekben a Thr850 oldallánc foszforilációja nagymértékben, míg a Thr695 foszforilációja csak kismértékben csökken. A foszfatázgátlószer CL-A alkalmazása jelentősen növelte a Thr850 oldallánc foszforilációját, de alig volt hatással a Thr695 foszforiláció mértékére. CL-A jelenlétében szintén csak a Thr850 oldallánc foszforilációs szintje mutatkozott érzékenynek a ROK gátlószerrel történő kezelésre. LPA kezelés alkalmazásakor mind a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja jelentősen megemelkedett, ugyanakkor az Y27632 előkezelés csak a Thr850 foszforilációját gátolta jelentősen. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncai egyaránt foszforilálódnak A7r5 sejtekben, mind fiziológiás és patológiás körülmények mellett. A Thr850 oldallánc az elsődleges foszforilációs hely a ROK enzim számára, míg a Thr695 foszforilációjáért feltehetően más kinázok felelősek.

A ROK a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációját *in vitro* azonos mértékben katalizálja, ezzel szemben *in vivo* ezek az oldalláncok megkülönböztetett módon foszforilálódnak. A jelenség hátterében álló mechanizmusok még nem ismertek. Egyik lehetséges hipotézis, hogy a különböző típusú sejtekben a különböző kinázok hozzáférése az

egyes oldalláncokhoz eltérő, valamint feltételezhető az is, hogy a két oldallánc megkülönböztetett foszforilációja lehetőséget biztosít a MYPT1-re ható eltérő jelátviteli útvonalak egyesítésére, a miozin foszfatáz gátlásának szintjén.

2. PP1 és PP2A enzimek gátlásának szerepe a leukémiás sejtek életképességének szabályozásában

A PP1 és PP2A membránpermeábilis toxinokkal történő gátlásának hatása a sejtek életképességére ellentmondásos, mivel a sejtípustól és a kísérleti körülményektől függően mind apoptózis indukcióját, mind túlélés fokozódását megfigyelték. Kimutattuk, hogy a THP-1 sejtek életképessége 10-100 nM CL-A-val történő kezelés hatására csökken. A sejteket a citotoxikus hatású daunorubicinnel (DNR) kezelve (2 µg/ml, 24 óra) az élő sejtek száma nagymértékben csökkent, ezt a DNR okozta sejtpusztulást azonban CL-A-val történő előkezelés nagymértékben mérsékelte.

A DNR-kezelés kismértékben, de szignifikánsan növelte a THP-1 sejtek foszfatáz aktivitást, míg 50 nM CL-A a kezeletlen sejtekhez viszonyítva mintegy 85 %-kal csökkentette a foszfatáz aktivitást DNR jelenlétében és távollétében egyaránt. A THP-1 sejtek DNR-rel történő kezelése a pRb fehérje degradációját váltotta ki, amelynek mértéke azonban jelentősen csökkent a CL-A-val történő előkezelés következtében. A CL-A növelte a pRb fehérje foszforilációs szintjét és mérsékelte a DNR által indukált kaszpáz-3 aktiválás mértékét is. Eredményeink arra utalnak, hogy a CL-A hatásának hátterében a pRb defoszforilációjának gátlása, valamint a kaszpáz-3 foszforilációval történő inaktiválása állhat. A foszforilált pRb kevésbé hasítható proteolitikus enzimekkel, ezért a CL-A-nak a pRb foszforilációs szintjét növelő hatása is hozzájárulhat az antiapoptotikus folyamatok kifejlődéséhez. A kaszpáz-3 inaktiválásában a PP2A enzim CL-A-val történő gátlása játszhat szerepet, amely a kaszpáz-3 defoszforiláció gátlását és a foszforilációval inaktivált forma fennmaradását okozza. Ezen kívül a PP2A gátlása elősegítheti a kaszpáz-3 foszforilációját katalizáló p38-MAP-kináz aktivitásának növekedését is.

3. A miozin foszfatáz szerepe a retinoblasztóma fehérje foszforilációs szintjének szabályozásában

A különböző foszfatáz típusoknak a pRb fehérje defoszforilációjában játszott szerepének vizsgálatára *in vitro* foszfatáz aktivitásméréseket végeztünk tisztított PP1c és

PP2Ac katalitikus alegységekkel, valamint miozin foszfatáz holoenzimmel (MPH), ciklin D/CDK4 kinázzal foszforilált MBP-pRb-C fragmentumot alkalmazva szubsztrátként. A ³²P-MLC20 szubsztrátot közelítőleg azonos mértékben (25-35%) defoszforiláló foszfatáz koncentrációkat alkalmazva a ³²P-pRb szubsztrát kismértékben defoszforilálódott PP1c által (2,6%), míg a PP2A enzim teljesen hatástalan volt. Ugyanakkor a MPH holoenzim mindkét szubsztrátot hasonló mértékben defoszforilálta, ami arra utalt, hogy a MYPT1 vehet részt a PP1c pRb szubsztráthoz való irányításában. Ezzel összhangban a MYPT1 célirányító funkcióját gátló anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ antitesttel a pRb foszfatáz aktivitás gátolható volt tisztított holoenzim és THP-1 sejtlizátum esetén is.

PP1 és PP2A aktivitás elkülönítésére különböző okadánsav (OA) (0,1-1000 nM) koncentrációk mellett mértük THP-1 sejtek lizátumában a foszfatáz aktivitást, és kimutattuk, hogy a pRb-C foszfatáz aktivitás csak 10-1000 nM OA, a PP1 gátlásra jellemző koncentrációk jelenlétében csökkent jelentősen, ami arra utal, hogy a PP1-típusú foszfatáz holoenzimek elsődleges szerepet játszanak a pRb defoszforilációjában. A MP szerepének további megerősítésére THP-1 lizátum foszfatáz aktivitását a MP-ra specifikus tiofoszforilált CPI-17 fehérje inhibitor jelenlétében is meghatároztuk. A CPI-17 specifikusan gátolja a MP holoenzimet, míg más PP1 holoenzimek aktivitására nincs hatással. Tiofoszforilált CPI-17-nel (3 µM) történő inkubálást követően a lizátum foszfatáz aktivitása mind ³²P-MLC20, mind ³²P-pRb szubsztráttal több mint 50%-kal csökkent, jelezve, hogy a MP jelentős mértékben hozzájárul a pRb defoszforilációjához THP-1 sejtekben. A CL-A-nak a pRb foszforilációt fokozó hatásában szerepe lehet a MYPT1 Thr695 és Thr850 oldalláncai foszforilációjának, amely a PP1c aktivitás gátlását eredményezi. Kimutattuk, hogy kezeletlen és DNR-rel kezelt sejtekben a Thr695 oldallánc viszonylag kismértékben foszforilált, míg a Thr850 oldallánc foszforilációja nem mutatható ki. CL-A kezelés hatására azonban mindkét oldallánc foszforilációja jelentősen emelkedik, és a magas foszforilációs szint a DNR-rel való együttes kezelés esetén is fennmarad. Ezen adatok arra utalnak, hogy a pRb foszforiláció szabályozása a MP foszforiláció-függő gátlásával valósulhat meg THP-1 leukémiás sejtekben. Mivel a kísérletekben alkalmazott 50 nM CL-A elsősorban a PP2A aktivitását gátolja, ezért a MP aktivitásának módosítása a CL-A által közvetve, a PP2A gátlása révén valósulhat meg. A feltételezett mechanizmus szerint a CL-A növeli a MYPT1-et foszforiláló kinázok aktivitását és/vagy gátolja a defoszforilációt végző foszfatázok működését. E mechanizmus összhangban van azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a PP2A katalizálhatja a foszfo-Thr695 és -Thr850 oldalláncok defoszforilációját.

A MP részvétele a pRb defoszforilációjában, valamint ebben a MYPT1 feltételezett célra irányító szerepe a MYPT1 és a pRb fehérjék kölcsönhatására utal, amit THP-1 sejtek lizátumából reciprok immunprecipitációval és MBP-pRb fragmentummal történő „pull-down” vizsgálattal is igazoltunk. A MYPT1, PP1c és pRb fehérjék kölcsönhatásának részletes tanulmányozása céljából felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérleteket is végeztünk. MBP-pRb-C-t immobilizálva és a felületre PP1c-t injektálva bizonyítottuk a pRb C-terminális fragmentumának és a PP1c-nek a kötődését, amely jelentős mértékben csökkent a PP1c-kötőmotívumot tartalmazó MYPT1-peptid jelenlétében. Ez arra utal, hogy a PP1c-pRb kölcsönhatásban a pRb „KLRF” PP1c-kötőmotívumszerű szekvenciájának van szerepe, amellyel viszont a MYPT1 eredményesen versenghet a PP1c-ért. Vad típusú és rövidített MYPT1 mutánsokat immobilizálva kimutattuk, hogy a pRb-C kötődik a teljes MYPT1 molekulához, valamint a MYPT1 N- és C-terminális szakaszaihoz is, amelyek közül az N-terminális peptidszakaszhoz való kötődésnek lehet jelentős szerepe a célirányításban. A szenzogramok alapján a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével meghatároztuk a pRb-C és PP1c, valamint a teljes MYPT1 és az N- és C-terminális fragmentumainak pRb-C-vel való kölcsönhatására jellemző asszociációs állandókat (K_a), amely a pRb-C-PP1c kölcsönhatásra $K_a = 1,42 \pm 0,12 \times 10^6$, a GST-MYPT1-pRb-C-re $K_a = 1,34 \pm 0,42 \times 10^7$, a His-MYPT1¹⁻⁶³³-pRb-C-re $K_a = 4,46 \pm 3,1 \times 10^6$, míg a GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴-pRb-C-re $K_a = 3,28 \pm 1,11 \times 10^6$ értéknek adódtak. Ezek alapján eredményeink a pRb defoszforilációjában az alábbi mechanizmust feltételezik: a PP1c a pRb-hez kötődve a pRb-defoszforiláció szempontjából nem alkot aktív komplexet. A MYPT1 a PP1c-hez és a pRb-hez egyaránt kötődve olyan komplex kialakulását teszi lehetővé, amelyben a PP1c pozicionálása a pRb hatékony defoszforilációját eredményezi.

A MYPT1 és pRb sejten belüli kolokalizációját és lokalizációjuk CL-A hatására bekövetkező változását is kimutattuk THP-1 sejtekben konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal végzett immunfluoreszcenciás kísérletekkel. Kezeletlen és DNR-kezelt sejtekben a MYPT1 és a pRb is főképp a sejtmagban detektálható és az egyesített kép a két fehérje részleges kolokalizációját mutatja. CL-A kezelés hatására a MYPT1 és a pRb a citoplazmába transzlokálódik. Ezzel szemben CL-A és DNR kezeléseket követően csak a MYPT1 citoplazmába történő transzlokációja figyelhető meg. A Thr826 oldalláncon foszforilált pRb lokalizációja a pRb eloszlásához hasonló, amiből arra következtethetünk, hogy a CL-A által indukált pRb-transzlokációért nem a Thr826, hanem valamely más pRb oldallánc foszforilációja felelős. A különböző kezelések hatását a MYPT1 sejten belüli lokalizációjára THP-1 sejtek szubcelluláris frakcióinak vizsgálatával is megerősítettük a THP-

1 sejtek citoszol és sejtmag frakcióinak Western blot analízisével. Kezeletlen és DNR-rel kezelt sejtekben a MYPT1 elsősorban a sejtmagban található meg, és a fehérje foszforilációs szintje alacsony. CL-A kezelés hatására a MYPT1 a citoszolba transzlokálódik, és transzlokációval párhuzamosan a MYPT1 fehérjesávok magasabb molekulatömeg felé történő eltolódása is megfigyelhető, ami feltehetőleg foszforilációnak tulajdonítható. Mivel a Thr695 és Thr850 oldalláncok foszforilációja nem befolyásolja a MYPT1 fehérjesávok pozícióját SDS-PAGE gélben, ezért valószínűsíthető, hogy a MYPT1 sávok eltolódása a Thr695 és Thr850 oldalláncoktól eltérő foszforilációs hely(ek) foszforilációjának eredménye. Ezen nem azonosított foszforilációs hely(ek) foszforilációja szabályozhatja a MYPT1 CL-A által indukált nukleáris exportját. A PP1c izoformák megoszlása a kezelések hatására nem változik a szubcelluláris frakciókban. Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a MYPT1 transzlokációja a sejtmagból a citoszolba önmagában, a PP1c részvétele nélkül valósul meg.

4. Tanninok foszfatázgátló hatásának vizsgálata

Penta-O-galloil-D-glükóz (PGG), a tanninok egyik fő alkotórésze, gátolja a natív és rekombináns PP1c (natív PP1c: $IC_{50} = 6,5 \mu M$, rPP1c δ : $IC_{50} = 0,70 \mu M$), valamint PP2A enzimek ($IC_{50} > 100 \mu M$) aktivitását. A PGG mellett az epigallokatekin-3-gallát (EGCG) ($IC_{50} = 0,93 \mu M$) és egy természetes keverék, az aleppói tannin ($IC_{50} = 0,52 \mu M$) is gátolta a PP1c aktivitást. Ezzel szemben viszont a galluszsav, a tannin alkotórészek egyik fő szerkezeti építőeleme hatástalannak bizonyult. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PGG a PP1 részlegesen szelektív gátlószere, amely alacsonyabb gátló koncentrációknál alkalmas lehet a PP1 és PP2A aktivitásának megkülönböztetésére is.

Rekombináns PP1c δ -t (rPP1c δ) immobilizálva SPR-módszerrel kimutattuk, hogy a PGG és az EGCG is kötődik a PP1c-hez. A kötődés kinetikája lassú asszociációra és lassú disszociációra utal, az asszociációs állandók PGG-re $K_a = 2,25 \pm 1,16 \times 10^5$ -nek, EGCG-re $K_a = 1,48 \pm 0,67 \times 10^6$ -nak adódtak. A PGG és EGCG kötődése jelentős mértékben csökken, ha az rPP1c δ felületet MC-LR vagy OA toxinokkal előkezeljük, és felgyorsul a képződő PP1c-EGCG és PP1c-PGG komplexek disszociációja is. Mivel a MC-LR és OA a PP1c Y-alakú katalitikus centrumának hidrofób árkához kötődnek, feltehető, hogy a PGG és EGCG kötődésének csökkenése az inhibitorok jelenlétében annak tulajdonítható, hogy a tanninszármazékokkal való kölcsönhatásban is ez a hidrofób régió játszik szerepet.

A PP1c PGG-vel és EGCG-vel történő kölcsönhatásának telítésátviteli differencia (Saturation Transfer Difference, STD) módszerrel történő NMR-vizsgálata a tanninszármazékok hidrofób gyűrűinek és a hidroxil-csoportoknak a részvételére utal az enzimmel való kölcsönhatás kialakításában. Ezzel összhangban vannak a molekulamodellezéssel kapott kezdeti dokkolási kísérletek eredményei is. Ezek alapján az EGCG a PP1c Y-alakú katalitikus centrumának hidrofób árkához kötődik, amelyben a hidrofób jellegű aromás gyűrűnek lehet alapvető szerepe. Ezt a kölcsönhatást tovább stabilizálják az EGCG hidroxil-csoportjai és a PP1c oldalláncai között kialakuló hidrogénkötések is.

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

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

AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A miozin foszfatáz (MP) miozinhoz is kötődő (MYPT1) regulátor alegysége Thr850 oldalláncának ROK általi foszforilációja a foszfatáz aktivitás gátlását eredményezi. Ez a foszforiláció fiziológiás és patológiás körülmények között simaizom sejtekben is lejátszódik, és az enzim új, különböző jelátviteli útvonalak által megvalósuló szabályozási lehetőségét veti fel.

2. A CL-A, egy foszfatázgátló membránpermeábilis toxin alkalmazásával igazoltuk, hogy a PP1 és PP2A enzimek fontos szerepet játszanak a leukémiás sejtek életképességének szabályozásában. A CL-A mérsékeli a daunorubicin (DNR) által indukált sejthalál mértékét, amelynek hátterében a retinoblasztóma fehérje (pRb) foszforilációjának fokozódása és DNR által indukált degradációjának csökkenése áll.

3. A MP defoszforilálja a pRb-t, amelynek során a MYPT1 alegység fokozza a PP1c-nek a pRb iránti aktivitását. A MP MYPT1 alegysége Thr695 és Thr850 oldallánci foszforilációjával történő inaktiválásának fontos szerepe lehet leukémiás sejtekben a pRb defoszforiláció gátlásában és ezzel a pRb foszforilációs szintjének növelésében. A pRb foszforilációs szintje a sejtciklus fázisátmeneteit befolyásolja, ezért a MP a leukémiás sejtek sejtciklusának és kemorezisztenciájának szabályozásában is részt vehet.

4. CL-A-val történő kezelés a MYPT1 és a pRb sejten belüli lokalizációjának megváltozását indukálja és elősegíti mindkét fehérje transzlokációját a sejtmagból a citoplazmába. A folyamatok hátterében a fehérjék fokozott foszforilációja állhat, és ezek a lokalizációs változások szintén befolyásolhatják a sejtek életképességét.

5. A tanninokat és azok egyes alkotórészeit (PGG és EGCG) egy új protein foszfatázt gátló vegyületcsaládként azonosítottuk, amelyek elsősorban a PP1 aktivitását gátolják az enzim hidrofób árkához való kötődéssel. Ezen molekulák szerkezeti módosítása lehetővé teheti új, hatékonyabb, farmakológiai szempontból is fontos foszfatázgátló molekulák előállítását.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kiss A, Lontay B, Bécsi B, Márkász L, Oláh E, Gergely P, Erdődi F.: Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: Its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal*. 20: 2059-2070. (2008) (IF: 4,887)

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

Egyéb közlemények

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

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

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

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások:

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

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

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

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

Poszterek:

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

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

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

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

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

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

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

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

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