

Székely Mihály (IV)

A protein arginin metiltranszferáz 5 mutációjának hatása a daganatképződésre

Székely Mihály¹, Ungvári Ádám László¹, Dr. Lontay Beáta¹

¹Orvosi Vegytani Intézet, Debreceni Egyetem

Bevezetés: A daganatos betegségek kialakulásának jelentős oka a sejtciklus és génexpresszió fenntartásáért felelős enzimek túl- és alulműködése, melyet mutációjuk mellett azok normálistól eltérő poszttranszlációs módosítása is okozhat. A protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) hiszton fehérjék szimmetrikus arginin dimetilációját katalizálja, amely a génexpresszió gátlását eredményezi. Szabályozásáért a RhoA aktivált kináz (ROK) és a miozin foszfatáz (MP) felelős a Thr80 foszforilációs helyen keresztül. A PRMT5 Thr80 szabályozó oldalláncának mutációit több daganattípusban leírták a COSMIC adatbázis alapján.

Módszerek: Vizsgálataink célja a PRMT5 Thr80 mutációinak biokémiai vizsgálata. Vad típusú, illetve mutáns PRMT5 fehérjét kódoló plazmiddal tsA201 sejteket transzfektáltunk és tisztítottunk. Tömegspektrometriás elemzéssel WT PRMT5 enzimhez képest a PRMT5 Thr80 mutáns fehérjék esetén egy új foszforilációs helyet, a PRMT5 Ser74 írtuk le ROK kezelés hatására. A PRMT5 Thr80 mutációinak aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálatához overexpresszált fehérjéket affinitási gélhez kötöttünk ki. A kötött PRMT5 fehérjét ROK-kal inkubáltuk, majd Western blottal vizsgáltuk a PRMT5 foszforilációt.

Eredmények: Míg a WT PRMT5 ROK kezelés hatására nem mutatott emelkedést a Ser oldalláncokon, addig a Thr80 mutánsoknál emelkedést detektáltunk. A mutáns PRMT5 in vitro ROK enzimaktivitási vizsgálattal egyértelmű PRMT5 Ser foszforilációt mutatott, amit a MP hozzáadása csökkentett. Elemeztük a WT és PRMT5 mutáns fehérjék által kötött hiszton szubsztrátok mennyiségét és azt tapasztaltuk, hogy a ROK hatására a mutáns PRMT5 szignifikánsan több hiszton szubsztrátot köt, ezen a további foszforiláció már nem változtatott. Eredményeinket máj karcinóma szöveti array vizsgálattal és más daganatos sejtvonalakon is validáltuk anti-foszfo-Ser74 antitesttel, és a szövetminták foszforilációjának grádussal és státusszal korreláló változását tapasztaltuk.

Megbeszélés: Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a tumorokban megtalálható mutációk a PRMT5 emelkedett aktivitását az enzim által megkötött szubsztrát mennyisége által szabályozza, és ezt a mutációk által okozott térszerkezeti változások és új aktiváló foszforilációs helyek expozíciója eredményezheti.