

OTKA 43448 „Lizofoszfolid mediátorok receptorai: Szfingo- és glicerolipid növekedési faktorokat kötő fehérjék azonosítása és jellemzése” című kutatási pályázatának zárójelentése

A természetben előforduló legegyszerűbb szerkezetű foszfolipidek, a lizofoszfatidsav (LPA) és a szfingozin-1-foszfát (S1P) nem membránalkotók, hanem jelátvivő molekulák, amelyek részt vesznek a sejtek túlélésének, osztódásának, differenciációjának és mozgékonyságának szabályozásában az egyszerű organizmusoktól az emberig. Kutatásaink célja ezen foszfolipidek – lizofoszfolidok – hatásmechanizmusának megismerése, a kölcsönható fehérjék azonosítása.

Az LPA és az S1P hatásait jelentős részben sejt felszíni receptorokon keresztül fejtik ki. Ezek a receptorok a 7-transzmembrán-hélixet tartalmazó receptorok nagy családjába tartoznak és a heterotrimer G-fehérjék közvetítésével kapcsolódnak a sejten belüli jelátviteli rendszerekhez. A legtöbb sejt egynél több ilyen receptort fejez ki a plazmamembránján, ezért az egyes receptor-típusokra szelektív aktiváló és gátló molekulák nélkülözhetetlenek mind a kutatási, mind a gyógyászati célú farmakológiai vizsgálatokhoz. A racionális hatóanyagtervezést hátráltatja azonban a térszerkezeti ismeretek hiánya. A membránfehérjéket közismerten nehéz tisztítani és kristályosítani, emiatt jelenleg még mindig csak egy heptahelikális receptor 3D szerkezetét határozták meg röntgen-krisztallográfiai módszerekkel, a szemben a fényt érzékelő rodopszint. Megközelítésünkben ezt a 3D szerkezetet használtuk fel a lizofoszfolid receptorok térszerkezetének modellezéséhez.

Az S1P különlegessége, hogy elsődleges és másodlagos hírvivőként is funkcionál. Az S1P a sejt belsejében keletkezik a szfingozin (Sph) foszforilációjával a szfingozin-kinázok (SphK) által katalizált reakcióban. Mivel az S1P elsődleges és másodlagos jelátvivőként kiváltott hatásai átfednek (például mindkét módon képes gátolni az apoptózist vagy intracelluláris kalcium mobilizációt kiváltani), ezért vita alakult ki a kutatási terület művelői között, többen tagadták, hogy az S1P valóban másodlagos hírvivő is lenne. Bonyolítja a helyzetet, hogy az S1P elsődleges hírvivőként tipikusan a sejtől kijutva ugyanazon vagy a környező sejteken lévő S1P-receptorokat aktiválja. Szintén ismeretlen azonban a kijutás mechanizmusa. A minimális rendelkezésre álló adat munkánk kezdetén az ABC-transzporterek szerepét vetette fel ebben a folyamatban.

Célkitűzésünk alapvetően az volt, hogy a következő három irányban bővítsük ismereteinket: 1) Az LPA és az S1P receptorok ligandkötőhelyének feltérképezése, új agonista és antagonistá vegyületek azonosítása, 2) Az S1P és a rokon szfingolipidek másodlagos hírvivő szerepének igazolása, a hatás közvetítésében szerepet játszó fehérjék azonosítása, 3) Az S1P plazmamembrán transzportjának felderítése.

Eredményeink:

1) Az LPA és az S1P receptorok ligandkötőhelyének feltérképezése, új agonista és antagonistá vegyületek azonosítása:

Korábbi munkánk során Dr. Tigyi Gábor laboratóriumában (University of Tennessee, Memphis, USA) kifejlesztettük az S1P₁ (korábbi nomenklatura szerint Edg1) S1P

receptor homológia modelljét, majd ligand-dokkolás segítségével megjósoltuk a receptor ligandkötésében meghatározó szerepet játszó aminosavakat. A térszerkezeti modell által jósolt kölcsönhatások igazolására ezeket az aminosavakat irányított mutagenézissel alaninra cseréltük, a módosított receptorokat RH7777-es sejtekben kifejeztetve azok aktiválhatóságát élő sejteken a ligand-indukált internalizáció követésével, valamint membrán-preparátumokon [³⁵S]GTPγS-kötéssel, a ligandkötést pedig radioligand assayben mértük. Ezzel a stratégiával sikeresen azonosítottuk az S1P kordinálásában és a ligand-szelektivitásban meghatározó aminosavakat (Parrill AL, Wang D, Bautista DL, Van Brocklyn JR, Lorincz Z, Fischer DJ, Baker DL, **Liliom K**, Spiegel S, Tigyi G (2000) Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 275(50):39379-84, Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, **Liliom K**, Tigyi G, Parrill AL (2001) A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J Biol Chem* 276(52):49213-20).

Fenti metodikával folytattuk az S1P₁-es receptor teljes ligandkötőhelyének feltérképezését jelen OTKA pályázat támogatásával. A fentebb leírt ionos kölcsönhatások a ligand poláros fejcsoportját rögzítik a megfelelő konformációban. Modellünk szerint azonban a ligand apoláros része a transzmembrán hélixek alkotta hirofób üregben helyezkedik el, amely körülbelül a plazmamembrán vastagságának feléig nyúlik be a receptor középső részén. Számítógépes modellünket finomítottuk és segítségével megbecsültük az S1P alifás láncá valamint a receptor kötőhelyének hidrofób ürege közötti apoláros kölcsönhatásokban résztvevő aminosavakat. A jósolt hidrofób oldalláncú aminosavakat különböző tulajdonságú aminosavakra cseréltük irányított mutagenézissel. A kötődési és funkcionális tesztekkel igazoltuk 18 oldallánc szerepét a hidrofób zseb kialakításában. Ezek az aminosavak - együtt a korábban azonosított hárommal, amelyek az S1P fejcsoportjával lépnek ionos kölcsönhatásba - most már egészében meghatározzák az S1P₁ receptor kötőhelyét. Eredményeinket a *Journal of Biological Chemistry* egyik első idei számában jelentettük meg (Fujiwara Y, Osborne DA, Walker MD, Wang DA, Bautista DA, **Liliom K**, Van Brocklyn JR, Parrill AL, Tigyi G (2007) Identification of the hydrophobic ligand binding pocket of the S1P1 receptor. *J Biol Chem* 282(4):2374-85).

Érdekességgként kiemelném, hogy a mutáns receptorok között hat olyant találtunk (L3.43G/L3.44G, L3.43E/L3.44E, L5.52A, F5.48G, V6.40L, and F6.44G), amelyek a vad-típusú enzimre jellemző módon kötik az [³²P]S1P ligandot, ám a ligandkötést követő receptor-aktiváció nem következik be. Mivel a heptahelikális receptorok alapvetően két konformációs állapot (inaktív és aktív) közötti egyensúlyban vannak, ezért fenti megfigyelésünk felveti ezeknek az aminosavaknak a szerepét a receptor konformációs állapotának ligandkötés következtében történő eltolódásában az aktív forma javára.

Az S1P₁ receptornak a természetes (S1P), valamint szintetikus (SEW2871) agonistáival alkotott komplexeinek térszerkezetét összevetve egymással létrehoztunk egy S1P farmakofór modellt, amely a receptort aktiváló ligandot általánosan jellemzi. Ezt a farmakofórt *in silico* összevetettük a NCI kémiai könyvtárral (National Institutes of Health, Developmental Therapeutics chemical library), amely szkrínelés a receptor két új nem-lipid agonistájának azonosításához vezetett. Összefoglalva: sikeresen azonosítottuk az S1P₁ receptor teljes ligandkötőhelyét és bebizonyítottuk, hogy modellünk megfelelő pontosságú ahhoz, hogy segítségével a racionális

hatóanyagtervezés ezen a receptoron - valamint a módszert értelemszerűen alkalmazva a rokon receptorokon is - végre megvalósítható legyen.

A lizofoszfolid (Edg) receptorok ligandkötését tanulmányozva Dr. Tigyi Gáborral együttműködésben egy kvalitatív modellt állítottunk fel a lizofoszfátid sav (LPA) receptorok aktiválhatóságára, amely szerint a ligand poláros fejcsoportját ion-kötések rögzítik közel a receptor extracelluláris felszínéhez, míg a ligand szénhidrogén lánc a transzmembrán-régió apoláros oldalláncaival hat kölcsön, mintegy „hidrofób-kapcsolóként” aktiválva a receptort. A modellt kiterjesztettük az antagonisták kötődésére is, amely esetben a ligand fejcsoportját ugyanazok az ionos kölcsönhatások kordinálják, mint az agonistákat, de a gátló ligand szénhidrogén lánc a receptor extracelluláris felszínén kapcsolódik apoláros oldalláncokhoz, tehát a receptor aktiválódása a hidrofób kapcsoló hiányában elmarad. Modellünk igazolására a lehető legegyszerűbb szerkezetű LPA-analógokat állítottuk elő: különböző lánchosszú alifás zsíralkoholokhoz közvetlenül kapcsoltuk a foszfát csoportot. Az Edg családba tartozó három LPA receptort egyedileg expresszáltuk RH7777-es sejtekben, amelyek endogénen nem fejeznek ki ilyen receptorokat. A receptorok által kiváltott intracelluláris kalcium jelek mérésével kimutattuk, hogy ezek a zsíralkohol-foszfátok (FAP) gyenge antagonistái az LPA₁-es és erős antagonistái az LPA₃-as receptoroknak. Kimutattuk továbbá, hogy a decil- és dodecil-FAP (FAP-10 és FAP-12) származékok szelektív aktivátorai az LPA₂-es receptornak, az első példát szolgáltatva LPA-receptor-típusra szelektív agonistára. Ligand-docking számításokkal megmutattuk, hogy a FAP-10 és FAP-12 molekulák az LPA-val teljesen analóg módon, kvalitatív modellünknek megfelelően kötődnek az LPA₂ receptorhoz (Virag T, Elrod DB, **Liliom K**, Sardar VM, Parrill AL, Yokoyama K, Durgam G, Deng W, Miller DD, Tigyi G (2003) Fatty alcohol phosphates are subtype-selective agonists and antagonists of lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 63(5):1032-42).

Bár ezt a munkát még az OTKA pályázat elnyerése előtt kezdtük meg a memphisi laborban, a kísérleti munka folytatásában való részvételt egyértelműen az OTKA támogatása tette lehetővé számomra. Pályázatom lényegi eleme volt, hogy a memphisi laborban megtanult farmakológiai metodikákra építve, azokat legalább részben itthon meghonosítva és a korábban az intézetünkben elsajátított biokémiai metodikákkal ötvözve egy új kutatócsoport szervezését kezdjem el az Enzimológiai Intézetben. A csoportalakítás kezdeti lépéseit megtettem a pályázat támogatásával és a receptor-farmakológiai vizsgálatok sikeres hazatelepítésén kívül szoros együttműködést alakítottam ki intézetünkön belüli, valamint más hazai és nemzetközi csoportokkal az intracelluláris lizofoszfolid receptorok tanulmányozására.

Az LPA receptor-típusokra szelektív ligandok fejlesztését a FAP molekulák újabb variációinak szintetizálásával és farmakológiai vizsgálatával folytattuk. Ezeket az új származékokat az eredetileg szintetizált telített alifás szénláncú FAP-ok fejcsoportjának és oldalláncának módosításával, telítetlen szénláncú FAP-ok és hidrolízisnek ellenálló alkil-foszfónátok, valamint telített és telítetlen tiofoszfátok szintézisével állítottuk elő. Az egyes LPA receptorokon végzett mérésekkel több LPA₁ illetve LPA₃ receptor-szelektív antagonistát azonosítottunk. A legérdekesebb talán az oleoil-tiofoszfát, amely egy pán-agonista és a tetradecil-foszfónát, amely egy pán-antagonista vegyület, utóbbi egyúttal az LPA₂ receptor első ismert antagonistája. Kimutattuk, hogy mindegyik FAP molekula aktiválja a nukleáris LPA receptor

PPAR γ transzkripciós faktort, valamint a pán-antagonista és a pán-agonista vegyületeink az LPA-hoz hasonlóan gátolták a lizofoszfolipáz D autotaxint (Durgam GG, Virag T, Walker MD, Tsukahara R, Yasuda S, **Liliom K**, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Wilke N, Siess W, Tigyi G, Miller DD (2005) Synthesis, structure-activity relationships, and biological evaluation of fatty alcohol phosphates as lysophosphatidic acid receptor ligands, activators of PPAR γ , and inhibitors of autotaxin. J Med Chem 48(15):4919-30).

2004-ben az OTKA támogatásával részt vettem a varsói FEBS kongresszuson, ahol új kollaborációt kezdeményeztem Ewa Swiezewska professzorral (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Varsó), akinek kutatási területe a természetben előforduló lipidek egy fontos nagy csoportjának, az izoprenoloknak és foszfát-származékaiknak az analitikai és biokémiai jellemzése. Az oligoprenil-foszfátok ugyanis többszörösen telítetlen és elágazó láncú zsíralkohol-foszfátoknak tekinthetők, tehát kézenfekvő volt megvizsgálni hatásukat a plazma-membrán és intracelluláris LPA receptorokra. Külön érdekessé tette az LPA receptorok farmakológiai vizsgálatát esetükben az a tény, hogy elágazó szénláncú LPA-származékot korábban még senki sem vizsgált. A kísérleteket a talán legismertebb izoprenol, a jelátvitelben és összetettebb izoprenolok valamint a koleszterin bioszintézisében is kulcsfontosságú farnezol és foszfát származékainak mérésével kezdtük el. A farnezil-foszfát (FMP) és a farnezil-difoszfát (FDP) egyaránt nagyhatékonyságú kompetitív antagonistának bizonyultak az LPA₃-as receptoron, közepes erősségű gátlószerek az LPA₂-es receptoron és praktikusán hatástalanok az LPA₁-es receptoron. Mind az FMP, mind az FDP aktiválta a PPAR γ nukleáris LPA receptort. Ezek a megfigyeléseink egyrészt kibővítik a receptor altípusra szelektív antagonisták körét és új molekulavázatot hoznak be a szelektív ligandok tervezésébe, másrészt felmerül a lehetősége, hogy ezek a molekulák és rokonaik az LPA jelátvitel új endogén szabályozói, mivel a különböző oligoprenil-foszfátok az izoprén-származékok bioszintézisének ismert köztitermékei (**Liliom K**, Tsukahara T, Tsukahara R, Zelman-Femiak M, Swiezewska E, Tigyi G (2006) Farnesyl phosphates are endogenous ligands of lysophosphatidic acid receptors: inhibition of LPA GPCR and activation of PPARs. Biochim Biophys Acta 1761(12):1506-14).

2) Az S1P és a rokon szfingolipidek másodlagos hírvivő szerepének igazolása, a hatás közvetítésében szerepet játszó fehérjék azonosítása:

Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorffal (University of Essen, Németország) közösen még Dr. Tigyi Gábor memphisi laboratóriumában kezdtünk bele a szfingozin-kináz - S1P – intracelluláris kalcium-mobilizáció folyamattal jellemzett jelátviteli rendszer tanulmányozásába. Eredeti megfigyeléseinket Xenopus oocitán végeztük, melynek során különböző sejtekből tisztított mRNS extraktumokat injektáltunk a béka petesejtekbe, majd mértük a közvetlenül a sejtekbe juttatott S1P hatását az intracelluláris kalcium felszabadulására.

Az OTKA támogatása lehetővé tette számomra, hogy folytatva az együttműködést Dr. Meyer zu Heringdorffal kísérleteinket emlős sejtvonalakon végezhessük. A lizofoszfolipidek jelátviteli szerepének tanulmányozásában korábban még nem

használt új metodikát vezettünk be annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy valóban képes-e az intracellulárisan keletkező S1P közvetlenül felszabadítani a kalciumot az endoplazmás retikulumból. Kísérleteinkben UV-lézer segítségével szabadítottuk fel az aktív szfingozin-1-foszfátot inaktív előanyagából *in situ* élő sejtekben konfokális mikroszkóp alatt. Először HEK293 sejteket használtunk, amelyekben korábbi munkáiban Dr. Meyer zu Heringdorf már vizsgálta a jelpálya létezését és működését. A HEK293 sejtek azonban többféle S1P receptort is kifejeznek a plazmamembránjukon, sőt az intracelluláris S1P szekréciójára is képesek, ami megnehezíti az eredmények értelmezését. Mindazonáltal a sejtfelszíni receptorok működését pertusszis-toxinos előkezeléssel felfüggesztve sikerült kimutatnunk az intracelluláris S1P azonnali kalcium-felszabadító hatását. Igazoltuk, hogy az S1P ugyanarra az endoplazmás reikulum kalcium tárolóra hat, amelyre a jól ismert másodlagos hírvivő IP3 is. Szerettük volna azonban kísérleteinket S1P receptorokat egyáltalán nem kifejező sejtekben is elvégezni, a hatás teljesen egyértelmű kimutatására. Tucatnyi emlős sejtvonalat vizsgáltunk meg ezzel a metodikával és sikerült az intracelluláris S1P által aktivált intracelluláris kalcium jeleket kimutatnunk SKNMC neuroblasztóma valamint HepG2 hepatóma sejtekben. Ezzel igazoltuk, hogy az S1P valóban képes másodlagos hírvivőként hatni, függetlenül a sejtfelszíni S1P receptoroktól (Meyer zu Heringdorf D, **Liliom K**, Schaefer M, Danneberg K, Jaggar JH, Tigyi G, Jakobs KH (2003) Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. FEBS Lett 554(3):443-9).

Az S1P másodlagos hírvivő szerepének tanulmányozása az OTKA támogatásával megalapított új intézeti csoportom egyik központi témája. Az intézetünkben nagy hagyományokra visszatekintő klasszikus biokémiai metodikákat alkalmazva belekezdünk az S1P és a jelátviteli folyamatokban jelentős szerkezeti rokonai célfehérjékkel történő kölcsönhatásának vizsgálatába. Megjegyezném, hogy ilyen vizsgálatokat korábban még nem végeztek, részben a lipidekkel és sejtizátumokkal történő mérések technikai komplikációi miatt. Munkánkban mi tisztított fehérjékkel dolgoztunk, hogy megszabaduljunk a kölcsönhatásokat zavaró mellékreakcióktól. Kimutattuk, hogy a szfingozin-1-foszfokolin, vagy közismertebb nevén szfingozil-foszforilkolin (SPC) szelektíven kölcsönhat a kalmodulinnal, az intracelluláris kalcium hatásának univerzális közvetítő fehérjéjével. A lipid kötődni képes mind a kalmodulin, mind annak a célfehérjéjén található azon felszínekhez, amelyeken keresztül a kalmodulin – célfehérje kölcsönhatás megvalósul, ezen keresztül gátolva a kalmodulin célfehérjét aktiváló hatását, sőt magának az adott célfehérjének az alapaktivitását is befolyásolni képes. Eredményeinket 2007 elején közlésre beküldtük (Kovacs E, **Liliom K** (2007) Sphingosylphosphorylcholine as a novel calmodulin antagonist. J Biol Chem).

Szintén az OTKA támogatását élvezve kezdtem együttműködést Dr. Fehér Zsigmonddal (Debreceni Egyetem) a humán szfingozin-kinázok feltételezett új izoformáinak azonosítására és jellemzésére. Dr. Fehér az ismert két kinázzal szekvencia-rokonságot mutató újabb két fehérjét azonosított, amelyek expresszióját élesztő sejtekben és a szfingozinnal szembeni esetleges kináz aktivitásukat küzösen tanulmányoztuk laboratóriumomban. Bár kezdeti eredményeink biztatóak voltak, végül ezekről az új fehérjékről kiderült, hogy lényegesen más aktivitásúak, egyikük egy diacilglicerin-kináz, másikuk pedig egy új ceramid-kináz.

3) Az S1P plazmamembrán transzportjának felderítése:

Intézetünkben Dr. Váradi András laboratóriumában nagy hagyományai vannak az aktív transzport fehérjék, közismert rövidítéssel ABC-transzporterek vizsgálatának. OTKA pályázatom előkészítése során dolgoztam ki azt a munkahipotézist, hogy az ABCC alcsaládba tartozó MRP fehérjéknek szerepe lehet az S1P exportjában. Dr. Váradi támogatta, hogy ötletemet az általuk már kidolgozott kísérleti technikákkal megvizsgáljam és javasolta, hogy működjünk együtt a tipikusan organikus anion transzporter MRP fehérjék funkcionális vizsgálatában.

Az S1P plazmamembrán-exportjának tanulmányozása során kezdeti kísérleteinkben az MRP1 multidrog-transzporter fehérjét vizsgáltuk ATPáz aktivitás mérésekben és tríciummal jelölt szubsztrátokkal direkt transzport mérésekben, MRP1 transzportert expresszáló Sf9 membránpreparátumokon. Egy új egyensúlyi enzimkinetikai modellt dolgoztam ki a transzporterben megfigyelt allosztérikus kölcsönhatások leírására (Kern A, Szentpetery Z, **Liliom K**, Bakos E, Sarkadi B, Varadi A (2004) Nucleotides and transported substrates modulate different steps of the ATPase catalytic cycle of MRP1 multidrug transporter. Biochem J 380(Pt 2):549-60, Szentpetery Z, Kern A, **Liliom K**, Sarkadi B, Varadi A, Bakos E (2004) The role of the conserved glycines of ATP-binding cassette signature motifs of MRP1 in the communication between the substrate-binding site and the catalytic centers. J Biol Chem 279(40):41670-8). Az S1P transzporter-aktivitásra kifejtett hatását kezdetben ATPáz mérésekkel tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy az S1P a 3-30 mikrométer koncentrációtartományban kismértékben fokozta az MRP1 aktivitását. Ezt követően az S1P befolyását vizsgáltuk az MRP1 fiziológiás szubsztrátjának, az LTC4-nek a transzportjára, radioaktívan jelölt [³H]LTC4 használatával. Ez a metodika sokkal érzékenyebb a transzport követésére, mint az ATPáz mérés. Kimutattuk, hogy az S1P gátolja az LTC4 transzportját. Szintén vizsgáltuk a másik ismert MRP-szubsztrát, a GS-NEM transzportját S1P jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy az S1P fokozza a jelölt GS-NEM transzportját. Mindezek együtt arra utalnak, hogy az S1P kölcsönhat az MRP1 transzporterrel és valószínűsíti annak szerepét az S1P szekrécióban. Előzetes eredményeinket a budapesti FEBS kongresszuson ismertettük 2005-ben. A munkát az OTKA új támogatásával (61501) jelenleg folytatjuk, most már triciált S1P birtokában közvetlen transzport mérésekben.

A transzporter munkája során felmerült a lehetősége annak, hogy az S1P exportjáért sejttypustól függően különböző transzporterek lehetnek felelősek. Például vérlemezkékben és más vérsejtekben is valószínűsítettük az ABCA1 transzporter szerepét. Dr. Váradi Andrással és Dr. Sarkadi Balázssal (OGYK, Budapest) együttműködve kezdtem bele ennek a transzporternek a vizsgálatába élő sejteken. B limfocitákon végzett méréseink biztatóak, előzetes eredményeink közzétételét a közeljövőben tervezzük. Az egyik legizgalmasabb kutatási témának továbbra is a lizofosfolipidek plazma-membrán transzportjának vizsgálata ígérkezik, amit az új OTKA pályázati támogatásom (61501) birtokában folytatok.

Összefoglalva, az OTKA támogatásának segítségével megalapítottam egy új kutatócsoportot intézetünkben. Laboratóriumomban folytatom a lizofosfolipid receptorok vizsgálatát, valamint tematikailag és metodikailag új szintet hozva a területre tanulmányozom a lizofosfolipidek jelátviteli és transzport folyamatait.