

## BEVEZETÉS

A fehérje foszforiláció-defoszforiláció számos sejt folyamat szabályozási mechanizmusa és a sejtfehérjék foszforilációs szintjét, az adott fiziológiai állapotnak megfelelően, a foszforilációt katalizáló protein kinázok és a defoszforilációt katalizáló protein foszfatázok aktivitásának aránya szabja meg. Ma már elfogadott tény, hogy a protein foszfatázok szabályozásának döntő szerepe van a fehérje foszforilációs szintek kialakításában és ez az utóbbi években a protein foszfatáz enzimes család megismerésére irányította a figyelmet. Habár a foszfoszerin/treonin specifikus foszfatázok száma meglehetősen nagy, eddig ismereteink szerint a sejtekben lejátszódó defoszforilációs folyamatok több mint 90%-a három eltérő típusú foszfatáznak, a protein foszfatáz-1 (PP1), protein foszfatáz-2A (PP2A) és a  $Ca^{2+}$ -kalmodulin függő protein foszfatáz-2B enzimeknek tulajdonítható. A PP1 enzimekben katalitikus alegység (PP1c) kapcsolódik szabályozó alegységekhez, amelyek feladata, hogy a PP1c-t mintegy „célra irányítsa”, azaz megfelelő orientációban a PP1c katalitikus funkciójának hatásosságát biztosítsa, de ezen kívül betölthet pl. foszforiláció-függő foszfatáz gátló funkciót, és szerepe lehet az enzim szubcelluláris lokalizációjában is.

A pályázat célkitűzése a PP1c-ből és a miozinhoz is kötődő, 130/133 kDa szabályozó alegységből (MYPT1) álló miozin foszfatáz (MP) sejt folyamatokat szabályozó hatásának tanulmányozása volt. A MP szerepe a miozin defoszforilációjában és ezzel a simaizom és nem-izom sejtek kontraktilis sajátosságainak a szabályozásában sokoldalúan tanulmányozott. Ezzel szemben a MP nem-izom sejtekben játszott egyéb szabályozó szerepéről keveset tudunk, ezért jelen pályázat fő célkitűzése az volt, hogy a MP nem-izom sejtek különböző sejt folyamataiban betöltött szerepét tanulmányozzuk.

## CÉLKITŰZÉSEK

A MP funkcióinak feltárásához három módszert alkalmaztunk: (a) az enzim aktivitását a PP1c katalitikus alegység gátlásával tanulmányoztuk, amely viszont csak részleges választ adhat a MP funkcióira mivel a PP1c-t más PP1 holoenzimek is tartalmazhatják; (b) tanulmányoztuk a MP holoenzimre specifikus fehérje inhibitorok, pl. a foszforilálható 17 kDa inhibitor fehérjéhez (CPI-17) hasonló fehérjék, valamint a MYPT1 alegységen található gátló foszforilációs helyek (Thr695/Thr696, Thr850/Thr852) szerepét; (c) azonosítani kívántuk a MYPT1-el kölcsönható fehérjéket a MP lehetséges célpontjainak feltárására.

A pályázat fő célkitűzéseit az alábbiakban fogalmaztuk meg:

1. PP1c inhibitorok azonosítása szabályozó funkcióinak vizsgálatára: (a) lehetséges inhibitor molekulák gátló hatásának jellemzése (b) új MP inhibitor peptidok azonosítása: KEPI (Kinase Enhanced Phosphatase Inhibitor) deléciós mutánsok és inhibitor jelölt peptidok gátló hatásának és kötődési viszonyainak feltárása.
2. MYPT1-el kölcsönható fehérjék azonosítása különböző sejtek szubcelluláris frakcióiban.
3. A MP szerepének feltárása a szinaptofizin, eNOS és Rb fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában: a MYPT1 különböző régióinak hatása a szubsztrátspecifitásra.
4. A neurotranszmitter felszabadulás és a fehérje foszforiláció kapcsolatának vizsgálata: a ROK és a MP szerepének tanulmányozása a neuronális fehérjék foszforilációjában.

A pályázat kidolgozása e célkitűzések mentén történt és főbb vonalaiban teljesült, habár néhány új elemmel is kiegészült, ill. az eredeti tervek egyes részeinek kidolgozása az előkísérletek alapján kevésbé tűntek fontosnak, ill. indokoltnak. Az eredmények ismertetése során, ahol az *eredmények közlésre kerültek a releváns közlemény zárójelben, dőlt betűvel* szerepel. Ahol az eredmények még közlésre várnak a fontosabb kísérleti adatok ábrán történő bemutatásával történik az eredmények ismertetése.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

## PP1c inhibitorok azonosítása szabályozó funkcióinak vizsgálatára

## a. Inhibitor molekulák gátló hatásának jellemzése.

A foszfatáz inhibitorokat két szempontból vizsgáltuk. Tanulmányoztuk a membrán-permeabilis foszfatáz inhibitorok hatását kemoterápiás szerekekkel kezelt leukémiás sejtek (THP-1 és KG-1) életképességére, valamint trombociták és növényi sejtek fiziológiai sajátosságaira. Ezen kívül tanulmányoztuk polifenol típusú, a tanninokban és a zöld teában is előforduló vegyületek foszfatázgátló sajátosságait tisztított enzimekkel.

**Protein foszfatáz gátlás és a sejtek életképessége.**

Klinikai intézettel együttműködésben végzett kísérleteink alapján felmerült annak a lehetősége, hogy leukémiás sejtek túlélését a sejtfehérjék foszforilációs szintje jelentősen befolyásolhatja (*Márkász és mtsai., Pathology and Oncology, 14:(3) pp. 285-292. (2008)*). E tekintetben a protein foszfatázok szerepe kevésbé ismert, ezért THP-1 és KG-1 sejtek daunorubicinnel (DNR) kiváltott sejthalálának mértékét jellemeztük protein foszfatáz-1 és -2A (PP1 és PP2A) inhibitor toxinok jelenlétében. Kalikulin-A (CLA, 1-100 nM) a leukémiás sejtek koncentrációfüggő sejtpusztulását eredményezte, míg a tautomycin (TM) csak 500-1000 nM koncentrációban indukált részleges sejtpusztulást. A DNR jelentősen csökkentette a sejtek életképességét. A PP2A-specifikus CLA (50 nM), vagy a PP1-szelektív TM (1000 nM) előkezelés viszont mérsékelte a DNR által kiváltott sejthalált. CLA növeli túlélést elősegítő fehérjék (ERK1/2, Akt és retinoblasztoma fehérje (pRb)) foszforilációs szintjét. A TM csak a pRb foszforilációjának mértékét növelte.

Eredményeink alapján a PP1 és PP2A enzimek eltérő szerepet játszanak a különböző túlélési faktorok foszforilációjának szabályozásában és ezek gátlásával kialakuló fokozott fehérje foszforiláció hozzájárulhat a daganatos sejtek kemorezisztenciájának kialakulásához. Eredményeink szerint a pRb defoszforilációját a PP1 holoenzimek közül a MP is katalizálja, a fenti eredmények azt sugallják, hogy (a) a TM sejtekben elsősorban a PP1-et gátolja; (b), a sejtek túlélését elsősorban a pRb foszforilációs szintje befolyásolja és a PP2A szubsztrátok (ERK1/2, Akt) foszforilációs szintjének jelentősége e folyamatokban kisebb; (c) a pRb foszforilációs változásainak követése modellként szolgálhat a PP1 sejten belüli aktivitás változásainak követésére és e felismerésünket további kísérleteinkben is felhasználtuk. Az eredmények egy része (*Kiss és mtsai., Cellular Signaling, 20: 2059-2070. (2008)*) közlésre került a pályázati időszakban.

**Protein foszfatáz gátlás trombocitákban, humán melanoma sejtekben és növényekben .**

Tanulmányozták a PP1 és PP2A enzimeket gátló CLA hatását a trombociták trombin receptort aktiváló peptid (TRAP) által történő aktivációjára. A CLA növelte a MYPT1 foszforilációját a Thr696 gátló helyen és ezzel a miozin foszfatáz aktivitás csökkenését eredményezte. CLA kezelés csökkentette a P-szelektin és a CD63 felszíni expresszióját, valamint a trombociták aggregációjának mértékét is. TRAP-aktivált trombocitákban a CLA meggátolta a trombocita mikropartikulák képződését. Eredményeik arra utalnak, hogy a PP1 és PP2A által katalizált defoszforilációs folyamatoknak szerepe van a trombocita mikropartikulák képződésének, valamint az alfa-granulomok és a lizoszomák szekréciós folyamatainak szabályozásában (*Simon és mtsai., Platelets 21: 555-562. (2010)*).

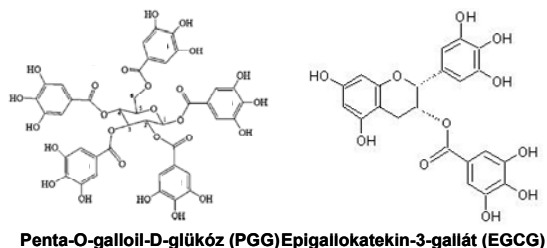
Humán melanoma metasztázis modellben tanulmányoztuk a heparinszerű 4-18 oligoszacharidot tartalmazó származékok antimigrációs és -metasztázis hatásait. Kimutattuk, hogy ezek a származékok hatékonyan gátolják a PP1 aktivitást és fiziológiai szerepük e hatásukkal is összefüggésben lehet (*Kenessey és mtsai., Thrombosis and Haemostasis, 102: pp. 1265-1273. (2009)*).

Kimutattuk, hogy a cyanotoxin mikrocisztin a protein foszfatázok gátlásával módosítja a növények mikrotubulus szerkezetét gátolva ezzel a gyökérfejlődést (*Máthé és mtsai., Aquatic Toxicol. 92: 122-130. (2009)*). A cilindrospermopszin, amely egy másik cyanotoxin, hasonló hatással van a

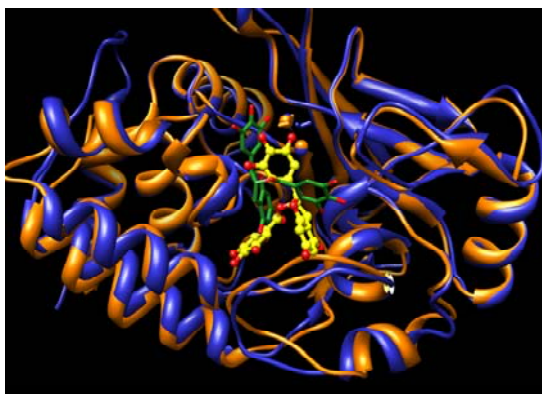
mikrotubulus rendszerre és a gyökérfejlődésre, azonban a mikrocisztinnel ellentétben a hatását nem a protein foszfatázok gátlásával fejti ki (*Beyer és mtsai., Toxicon 54: 440-449. (2009)*). E témában történő együttműködésünk eredménye, hogy a partnerünk tisztított mikrocisztin-LR-t bocsátott rendelkezésünkre olyan mennyiségben, amely lehetővé tette kémiai átalakítását biotinilálási reakcióban. A biotin-MC-LR nagy segítségünkre volt PP1c-kötődési vizsgálatokban a hidrofób szubsztrátkötő árok blokkolására és felhasználásával tervezzük PP1-hez kötődő fehérje partnerek elválasztását és azt követő proteomikai azonosítását.

### **Polifenolok azonosítása, mint új PP1c inhibitorok.**

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a gallotannin gátolja a PP1 és a PP2A aktivitását is, de a PP1 érzékenyebbnek tűnt e vegyületek gátló hatása iránt. Mivel a gallotannin különböző, polifenol szerkezeti részeket tartalmazó vegyületek keveréke, indokoltnak tűnt kémiaileg tiszta vegyületek gátló hatásának vizsgálata és a gátlás szerkezeti hátterének feltárása. Ehhez először egy együttműködési kutatás teremtette meg a lehetőséget, amelynek keretében a penta-O-galloil-D-glükóz (PGG), a tanninok egyik fő alkotórészének kötődését vizsgáltuk alfa-amiláz enzimhez Biacore technikával (*Gyémánt és mtsai., Biochim. Biophys Acta 1794: 291-296 (2009)*), amelynek során az is bebizonyosodott, hogy a PGG kötődése az amiláz enzim bizonyos hidrofób régióhoz történik. Ilyen jellegű hidrofób szubsztrátkötő árok a PP1c-ben és a PP2Ac-ben is előfordul, ami a kölcsönhatás szerkezeti hátterének feltárása szempontjából is új vizsgálatok igényére irányította a figyelmet. Kimutattuk, hogy a PGG nagyobb hatékonysággal gátolja a PP1c-t ( $IC_{50} = 0,26-0,64 \mu M$ ) mint a PP2Ac-t ( $IC_{50} = 6,6 \mu M$ ). Tanulmányoztuk a zöld teában előforduló epigallokatechin-3-gallátot (EGCG) és származékainak a gátló hatását is a PP1c és PP2Ac aktivitására és a PGG-hez hasonló specificitás különbségeket találtunk a két enzimre. A PP1c PGG-vel és EGCG-vel történő kölcsönhatását felületi plazmon rezonancián alapuló (Biacore) kötődési vizsgálatokkal is igazoltuk. Az EGCG és a PGG PP1c-hez való kötődését az enzim katalitikus centrumának hidrofób árkaéhoz kötődő



Penta-O-galloil-D-glükóz (PGG)Epigallokatechin-3-gallát (EGCG)



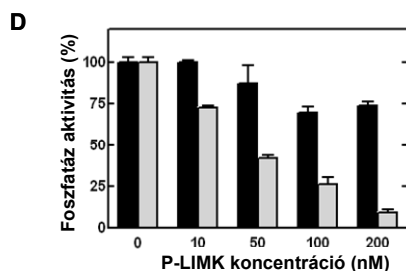
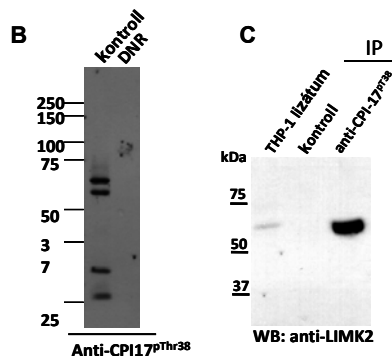
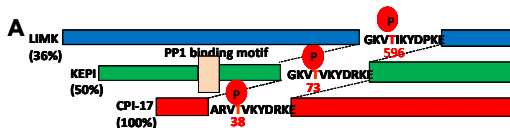
1. ábra A PGG és a EGCG szerkezete és az EGCG dokkolása a PP1c (kék) és PP2Ac (narancssárga) molekulába. Az EGCG pozíciója a PP1c-EGCG komplexben (sárga) és a PP2Ac-EGCG komplexben (zöld).

toxinok (mikrocisztin vagy okadánsav) hatékonyan gátolták. NMR telítés átviteli differencia (Saturation Transfer Difference, STD) mérésekkel igazoltuk, hogy az EGCG és a PGG aromás gyűrűi részt vesznek a PP1c-vel való kölcsönhatásban, valamint valószínűsíthető a molekulák hidroxil csoportjainak szerepe is a kölcsönhatás stabilizálásában hidrogén kötések kialakításával. Molekula modellezésen alapuló dokkolást végeztünk az EGCG-PP1c komplex valószínű szerkezetére: a konformációs állapotok legkisebb energiájú képviselőinek azon modellek bizonyultak, amelyekben az EGCG a hidrofób árokhoz kötődik és a hidroxil csoportok hidrogén-kötésekkel stabilizálják a kölcsönhatást. Az EGCG-PP2A komplexel végzett összehasonlító dokkolási kísérletek pedig azt igazolták, hogy az EGCG a PP2Ac-ben is a hidrofób árokhoz kötődik, azonban a molekula pozíciója jelentősen eltér a PP1c-ben meghatározottaktól (*1. ábra*). Az PGG, EGCG és származékai 10-60  $\mu M$  koncentrációban HeLa és THP-1 leukémiás sejtek életképességét jelentős mértékben csökkentik és ezen hatásuk korrelációt mutat foszfatázgátló képességükkel.

Összefoglalva: az itt vizsgált polifenolok a PP1c kevésbé hatékony gátlószerei, mint az ismert foszfatázgátló toxinok, de velük szemben kevésbé toxikusak és jó alapként szolgálhatnak új foszfatázgátló molekulák kifejlesztésére (*Kiss és mtsai, FEBS Journal, közlés alatt*: a bírálók módosító javaslatai alapján a kézirat a folyóirathoz visszaküldve).

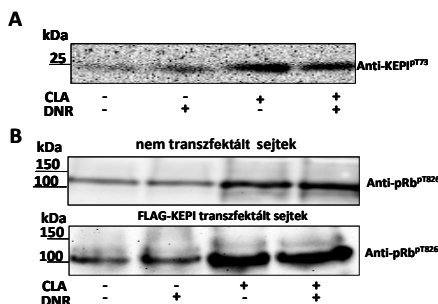
## b. Új MP inhibitor peptidek azonosítása: KEPI (Kinase Enhanced Phosphatase Inhibitor) delecíós mutánsok és inhibitor jelölt peptidek gátló hatásának és kötődési viszonyainak feltárása

A KEPI fehérjét kétféle rekombináns formában, GST- és hexahisztidint tartalmazó peptiddel kapcsolt formában (GST-KEPI és His-KEPI) állítottuk elő baktériumban történő expresszióval. A tisztítást Glutathione-Sepharose 4B vagy Ni<sup>2+</sup>-agaróz kromatográfiával végeztük a baktériumok lizátumából. Az izolált GST-KEPI fehérjéről felszíni plazmonrezonancián alapuló (Biacore) mérésekkel kimutattuk, hogy az defoszforilált állapotban is képes a protein foszfatáz-1 katalitikus alegység (PP1c) megkötésére. Protein kináz C-vel foszforilált His-KEPI fehérjét használva kimutattuk, hogy az gátolja a PP1c aktivitását. A fehérje expresszió hatékonysága azonban kismértékű volt, ezért a tervezett mutációkat és mutánsok expresszálását nem kezdtük el.



2. ábra Új foszfátázgátló fehérjék azonosítása. A, CPI17 fehérjéhez hasonló fehérjék szerkezetének összehasonlítása. B, CPI17 foszforilációs szekvenciákat tartalmazó fehérjék azonosítása THP1 sejtekben. C, A LIM-kináz (LIMK) azonosítása a fehérjék között. D, PKC-vel foszforilált LIMK PP1c-t (szürke oszlopok) és MP-t (fekete oszlopok) gátló hatása.

nagymértékben defoszforilálódik, míg CLA jelenlétében a foszforilációs szintje magas marad függetlenül a DNR jelenlététől. Flag-LIMK expresszióját és tisztítását követően a LIMK-t PKC-vel foszforiláltuk és a gátló foszforilációs szekvencia foszforiláltságát foszfospecifikus antitesttel bizonyítottuk. A foszforilált LIMK gátolta a PP1c és az MP aktivitását is (2. ábra, D).



3. ábra KEPI transzfekció hatása a retinoblastóma fehérje (pRb) foszforilációjára MCF7 sejtekben. A, KEPI foszforilációja MCF7 sejtekben DNR és CLA jelenlétében és távollétében. B, A pRb foszforilációja nem transzfektált és KEPI-vel transzfektált MCF7 sejtekben.

Megvalósítottuk viszont a Flag-KEPI expresszióját HEK293 sejtekben és igazoltuk a tisztított fehérje foszforiláció függő gátló hatását a PP1c-re. A KEPI fehérje PP1-et, és ezek között az MP-t gátló lehetséges hatására az alábbi kísérletek irányították a figyelmet. A daganatos sejtek nyugalmi állapotában tapasztalt magas fehérje foszforilációs szint miatt felvetődik annak a lehetősége, hogy a PP1 eleve gátolva lehet, és ebben PP1 specifikus fehérje inhibitoroknak lehet szerepe. Ezért megvizsgáltuk a miozin foszfatázt specifikusan és foszforiláció-függő módon gátló fehérje a CPI17 jelenlétét és foszforilációját THP-1 sejtekben, amelynek során számos, a CPI17 foszforilációs helyére specifikus antitesttel keresztreakciót adó fehérjét mutattunk ki (2. ábra, B). A CPI17 fehérjén kívül a leghatározottabb jelet mutató fehérjét LIM-kinázként (LIMK) azonosítottuk (2. ábra, C). A CPI17 ill., a CPI17 foszforilációs hely környezetének (ARV(foszfóT)VKYDRREL) szekvenciájához (2. ábra, A) a CPI-17 rokon fehérjéken (KEPI, PHI-1) kívül a LIMK és a szerológiailag meghatározott emlő-tumor antigénnel rokon fehérje (nincs feltüntetve az ábrán) mutatta a legnagyobb fokú hasonlóságot. THP-1 sejtekben a LIMK gátló foszforilációs helye DNR kezelés hatására

További kísérleteinkben megvizsgáltuk a KEPI transzfekciójának lehetőségét különböző sejtekbe. HeLa sejtekkel végzett kísérleteink arra utaltak, hogy a PP1c csendesítése a pRb foszforilációs szintjének növekedését eredményezi, ezzel ismételtlen bizonyítékot kaptunk arra, hogy a defoszforilációért elsősorban a PP1 lehet felelős. Ezért a KEPI sikeres transzfekciójával és foszforilációjának indukálásával (pl. a PP2A gátlására alkalmas CLA koncentrációnál) modellünk szerint a pRb foszforiláció növekedését várhatjuk. A THP-1 sejtek transzfektálása FuGene HD reagenssel sikertelen volt. A THP-1 sejtek azonban tartalmaznak KEPI-t, ezért ezekben forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA)

aktiváltuk a protein kináz C-t (PKC), ami a KEPI megnövekedett foszforilációját és ezáltal aktivációját eredményezte. Az aktivált KEPI megnövelte a pRb foszforilációs szintjét THP-1 sejtekben. Ezek a kísérletek azonban még nem eléggé meggyőzőek. Az MCF-7 sejtek nem tartalmaznak endogén KEPI fehérjét, így a FLAG-KEPI fehérje sikeres transzfekciója lehetővé tette a KEPI hatásának tanulmányozását a pRb foszforilációs szintjére. Western Blot analízissel és immunfluoreszcenciával is megerősítettük a transzfekció hatékonyságát. Transzfektált MCF-7 sejtekben a KEPI fehérje foszforilálódik a gátló szekvencián (3. ábra, A) és a CLA előkezelés megnövelte a foszforiláció mértékét és ezáltal a KEPI fehérje aktivációját (3. ábra, B). Az aktiválódott KEPI fehérje pedig a pRb fehérje foszforilációs szint növekedését eredményezte (3. ábra, B). Nem transzfektált MCF-7 sejtekben a CLA előkezelés kisebb mértékben növelte meg a pRb fehérje foszforilációs szintjét. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a LIMK és a KEPI foszforilációja szerepet játszhat a foszfatázok gátlásában, daganatos sejtekben és érdekes adatokkal szolgálhat még az eddig nem azonosított, CPI17-szerű fehérjék további tanulmányozása is. Ezek a folyamatok a daganatos sejtekben a foszfatázok szabályozásának egy új mechanizmusát vetik fel, amelynek behatóbb feltárása a farmakológiai befolyásolás lehetőségére is felhívhatja a figyelmet. *Az eredmények szakmai konferenciákon poszter vagy előadás formájában kerültek bemutatásra, közlésre történő előkészítése folyamatban van.*

## 2. MYPT1-el kölcsönható fehérjék azonosítása különböző sejtek szubcelluláris frakcióiban.

### A MYPT1 kölcsönhatása neuronális fehérjékkel

Korábbi eredményeink alapján a MP a neuronokban is előfordul és feltehetően fontos szerepet játszik a neurotransmitter felszabadulás szabályozásában, mivel a preszinapszisok egyik fő holoenzimként azonosítottuk. A MYPT1-el kölcsönható fehérjeként azonosítottuk a PP1c mellett a szinaptofizint és a Rho-kinázt is. Az MYPT1 további neuronális kölcsönható partnereit GST-MYPT1 „pull-down” kísérletekben elkülönített fehérje frakciókból azonosítottuk tömegspektrometriás eljárással. A MYPT1-el kölcsönható fehérjeként azonosítottunk számos fehérjét, amelyek közül a neuronális szabályozás szempontjából fontos komponens a szinapszin, szintaxin, SNAP-25, szintaxin-kötő fehérje, szinaptotagmin, Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin függő protein kináz II (CaMK-II), kalcineurin (protein foszfatáz-2B), valamint korábban már MYPT1 kölcsönható fehérjeként azonosított Tau fehérje és 14-3-3 fehérje izoformák. A felsorolt fehérjék közül a MYPT1 szinapszinnal, szintaxinnal, CaM-kináz-II-vel és kalcineurinnal történő kölcsönhatását immunoprecipitációt vagy „pull-down”-t követő Western blot kísérletekben is megerősítettük. A MYPT1 és SNAP-25 közötti kölcsönhatást Biacore módszerrel is megerősítettük (*Lontay és mtsai., J. Neurochemistry*, a bírálók javaslata alapján javított kézirat beküldés előtt).

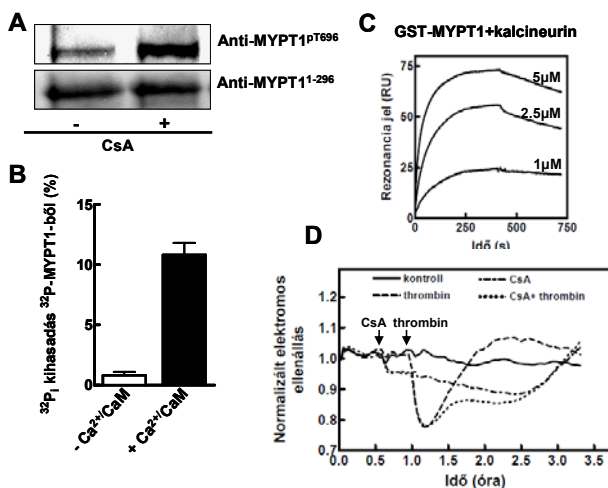
### A MYPT1 családba tartozó TIMAP kölcsönhatása PP1c-vel és jelentősége a moezin defoszforilációjában

A TGF- $\beta$  által gátolt membrán-asszociált fehérje (TIMAP) nagymértékben expresszálódik endotél sejtekben és a protein foszfatáz-1 katalitikus alegység (PP1c) szabályozó fehérjéjének tekinthető. Felszíni plazmonrezonancián alapuló (SPR) kötődési mérésekkel kimutattuk, hogy a PP1c és a TIMAP defoszforilált formája között stabil komplex ( $K_a = 1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) jön létre. A PP1c-TIMAP asszociáció erőssége a TIMAP protein kináz-A (PKA) és glikogén-szintetáz kináz-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) által történő foszforilációja után sem változik jelentősen, habár az asszociáció-disszociáció sebességi állandóiban megfigyelhető változás. Defoszforilált TIMAP gátolja foszfomoezin szubsztrát PP1c $\beta$  izoenzim által történő defoszforilációját, míg ez a gátlás csekély mértékű a TIMAP kettős foszforilációját követően. Az endotél sejtek forskolin kezelése (PKA aktiválás) kivédi az endotél sejtek trombin által okozott „barrier” funkciójának sérülését. GSK3 $\beta$  inhibitorral végzett kísérleteink arra utaltak, hogy a forskolin védő hatása csak akkor érvényesül, ha egyidejűleg a GSK3 $\beta$  is aktív, azaz feltehető, hogy a védő hatás a TIMAP kettős foszforilációjának és a PP1 aktiválásának tulajdonítható, amely az ERM fehérjék csökkent foszforilációs szintjében nyilvánul meg (*Czikora és mtsai., Biochimie*, 93: 1139-1145 (2011)).



## A MYPT1 kölcsönhatása kalcineurinnal és jelentősége az endotél sejtek fiziológiai funkcióiban

A miozin foszforiláció az endotél sejtek „barrier” funkciójának változásaiban fontos szerepet játszik, ami a foszforiláció mértékét kialakító enzimek, a miozin kinázok és a miozin foszfatáz (MP) aktivitásának szabályozására irányította a figyelmet. Korábbi eredmények szerint a kalcineurin ( $\text{Ca}^{2+}$ -kalm modulín függő protein foszfatáz-2B, PP2B) foszfatáz aktivitásának ciklosporin-A (CsA)-val történő gátlása az aktin-citoszkeleton szerkezeti átrendeződését elősegítve hozzájárul a sejtek közötti rések képződéséhez és ezzel a „barrier” diszfunkció fenntartásához. A kalcineurin hatásmechanismusa azonban nem ismert, de feltételezhető, hogy közvetlenül, vagy közvetve a miozin foszforilációt befolyásolhatja. Kimutattuk, hogy endotél sejtekben ciklosporin-A (CsA) növeli a MYPT1 Thr695 oldallánca foszforilációjának mértékét, ami a MP gátlását okozva magasabb miozin foszforilációs szintet eredményez (4. ábra, A). Mivel a CsA a kalcineurin specifikus gátlószere, ezért az eredmények alapján feltételezhető, hogy a kalcineurin részt vesz a MP aktivitásának szabályozásában. Tisztított fehérjék alkalmazásával kimutattuk, hogy a kalcineurin  $\text{Ca}^{2+}$ -kalm modulín függő módon defoszforilálja a MYPT1-et (4. ábra, B). Felületi plazmonrezonancián alapuló mérésekkel igazoltuk, hogy a MYPT1 és a PP2B között létrejövő fehérje-fehérje kölcsönhatás meglehetősen stabil és az defoszforilált MYPT1-el is kialakul (4. ábra, C). MYPT1 fragmentumokkal végzett kötődési kísérletek arra utalnak, hogy a kölcsönhatás kialakításában elsősorban a MYPT1 N-terminális régiói



**4. ábra** A kalcineurin és a MYPT1 kölcsönhatása és jelentősége a transzendentáliális ellenállás szabályozásában. **A**, CsA növeli a MYPT1 gátló hatású foszforilációját endotél sejtekben. **B**, Foszfórlált MYPT1  $\text{Ca}^{2+}$ -kalm modulín függő defoszforilációja kalcineurinnal. **C**, A MYPT1-kalcineurin kölcsönhatás jellemzése Biacore mérésekkel. **D**, CsA, trombin és ezek kombinációjának hatása a transzendentáliális ellenállásra.

annak a lehetősége, hogy a két fehérje szignalizációs jelentőségű fehérjekomplexek alkotórésze lehet. Ezzel összhangban a MYPT1 és a kalcineurin kölcsönhatását szinaptoszómákban is kimutattuk (ld. korábban „A MYPT1 kölcsönhatása neuronális fehérjékkel”), ami e szabályozó mechanizmus általános jellegére utalhat (Az eredmények közlésre történő előkészítése megtörtént a kézirat megírása folyamatban van).

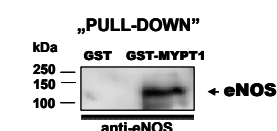
### 3. A MP szerepének feltárása a szinaptofizin, eNOS és Rb fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában: a MYPT1 különböző régióinak hatása a szubsztrátspecifitásra.

A MYPT1-nek a neuronális fehérjékkel történő kölcsönhatásának vizsgálata során a szinaptofizin nagy ionerősségű mosásokat alkalmazva nem bizonyult stabil kölcsönható partnernek, ezért további vizsgálatától eltekinttünk, különösen az új, szabályozási szempontból fontosabbnak tűnő neuronális kölcsönható partnerek ismeretében.

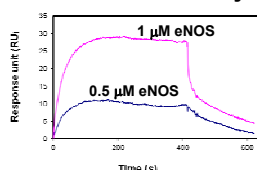
vesznek részt. Endotél sejtek trombinval történő stimulusa során a MYPT1 Thr695 foszforilációja tranziens, ezzel szemben a CsA-val történő előkezelést követő trombin stimulus esetén a MYPT1 foszforiláció fenntartott marad, ami arra utal, hogy a kalcineurinnak jelentős fiziológiai szabályozó szerepe lehet a MP aktivitás szabályozásában. Ezzel összhangban az endotél sejtek barrier funkcióját jellemző transzendentáliális elektromos ellenállás mérése is igazolta, hogy a kalcineurin gátlása CsA-val önmagában viszonylag kismértékű ellenállás csökkenést eredményez, azonban részben növeli és hosszabb ideig fenntartottá teszi a trombin által indukált ellenállás csökkenést. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a kalcineurin és a MYPT1 között nem csak egyszerű enzim-szubsztrát kapcsolat van, hanem a két fehérje kölcsönhatása ennél sokkal stabilabb, amely alapján felvetődik

## A miozin foszfatáz (MP) és regulátor alegysége (MYPT1) kölcsönhatása endothéliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) enzimmal

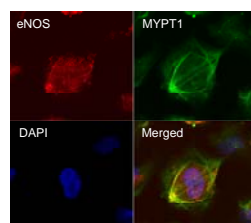
Kutatási együttműködésben tanulmányoztuk az endothéliális nitrogén-monoxid (NO) szintetáz (eNOS) sajátságait (*Serfőző és mtsai., Neurochem. Res. 33: 569-578 (2008); Altorjay és mtsai., Int J Immunopathol Pharmacol. 24: 323-35, 2011*). Az eNOS konstitutívan expresszáldó, 133 kDa molekulatömegű fehérje. Az enzim NO-t szintetizál, amely egyéb hatásai mellett indukálja a fehérjék S-nitrozilálás- és a tirozin nitrálásal történő módosítását. Az eNOS aktivitása szubsztráttal kompetitív gátlószerekkel (pl. L-NAME) és foszforilációval módosítható, amely által számos fehérje szabályozódik. Az eNOS aktivitását a Ser1177 aminosav foszforilációja fokozza, míg a Thr495 aminosavon történő foszforiláció gátlást okoz. A defoszforilációt végző protein foszfatáz holoenzimeket nem azonosították, így pl. nem ismert, hogy az eNOS és a MP kölcsönhatásba lép-e. Kimutattuk, hogy a sejtciklus M fázisában, a profázistól kezdődően megnövekszik az eNOS expressziója, különösen a Ser1177 oldaláncon foszforilált formájának immunfluoreszcens jele, amelynek jelenléte szembevető a mikrotubulusok mentén és a citocentrumokban. Az eNOS számos fehérje nitrozilációját és nitrálását indukálja, ami L-NAME hatására csökken. A nitro-tirozin és a nitrozo-cisztein immunfluoreszcens jelének csökkenésével párhuzamosan a mikrotubulusok szerkezeti megjelenése megváltozott és nagymértékben lecsökkent az osztódó sejtek száma. Az eNOS aktivitásának alapvető feltétele a Thr495 oldallánc defoszforilált állapota. Interfázisban lévő sejtekben



SPR-kötődés eredménye



Kolokalizáció HUVEC-ben



**5. ábra A MYPT1 és az eNOS kölcsönhatásának kimutatása „pull-down” kísérletekben, Biacore technikával és konfokális fluoreszcencia mikroszkópiával.**

konfokális mikroszkópos felvételei alapján a MP és eNOS kolokalizációja figyelhető meg a mikrofilamentumok mentén, amelyekben a Thr495 defoszforilált állapotban található. Az eNOS és a MP kölcsönhatását ezen kívül „pull-down” módszerrel is igazoltuk (5. ábra), amit tisztított fehérjékkel Biacore technikával is megerősítettünk. Ezen kívül a két fehérje kölcsönhatása konfokális fluoreszcens mikroszkópiával is kimutatható primer endothél sejtenyészeten (5. ábra). Felfigyeltünk a két fehérje aktiváló és gátló foszforilációs helyein foszforilált formáinak lokalizációs változásaira, amely széruméheztetés hatására is bekövetkezhet. Konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink szerint széruméheztetett sejtekben a MYPT1 és az eNOS kolokalizációja figyelhető meg a mikrotubulusok mentén és a citocentrumokban. Osztódó HUVEC sejtekben az aktivitást fokozó Ser1177 foszforilációjának fokozódását, ugyanakkor a Thr495 foszforilációjának csökkenését detektáltuk immunfluoreszcens felvételeken.

HEK293 sejteket MYPT1-et és/vagy eNOS-t kódoló plazmiddal transzfektáltunk. A pcDNA/eNOS plazmiddal transzfektált sejtekben PKC aktivátor PMA kezelés hatására növekszik a Thr495 és a Ser1177 foszforilációja, ami tovább fokozódik PMA és a foszfatázgátló CLA együttes hatására. Az eNOS-t túltermelő HEK293 sejtek NO szintetizáló képességét a Thr495 fokozott foszforilációja gátolja. MYPT1-et és eNOS-t kódoló plazmiddal kotranszfektált HEK293 sejtek lizátumából az eNOS és a MYPT1 fehérje koprecipitátumát detektáltuk. Mindezek mellett HEK293 sejtekben MYPT1 expresszióval sikerült tisztított miozin foszfatáz holoenzimet izolálnunk, amely a PP1c-hez képest az eNOS-fosfo-Thr495 fokozott defoszforilációját eredményezte.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az eNOS-MYPT1 kölcsönhatás HUVEC sejtekben létrejön, aminek szerepe lehet az aktin mikrofilamentumok, valamint a mikrotubulusok képződésének és elbomlásának szabályozásában. A két fehérje kölcsönhatását HEK293 sejtekkel végzett vizsgálataink is alátámasztják. Az eNOS foszforiláció változásának szerepe van a sejtciklus szabályozásában. Eredményeink azt sugallják, hogy a MP az eNOS egyik defoszforiláló foszfatáza lehet az aktivitást gátló helyen (Thr495) és ezzel az eNOS aktivitását szabályozhatja. Előkísérleteink szerint az eNOS-MYPT1 sejten belüli „közelségének” másik következménye lehet, hogy a MYPT1 nitrálódik, amelynek szerepe lehet az alegység-kölcsönhatások, azaz a PP1c-vel való kapcsolódás szabályozásában, azonban ezek az adatok még további megerősítésre várnak (*Az eredmények összegzése közlésre elkezdődött, várhatóan a jövő év első felében nyújtjuk be közlésre a kéziratot*).

**A MYPT1 és a pRb kölcsönhatása és szerepe a sejtek túlélésében**

A pRb a sejtciklus egyik fontos szabályozó fehérjéje, hiperfoszforilációja a G1→S átmenetet, defoszforilációja pedig a mitózisból történő kilépést teszi lehetővé. Leukémiás sejtek különböző kemoterápiás szerekkel történő kezelése során a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek aktiválását, valamint ezzel párhuzamosan a pRb fokozott defoszforilációját és degradációját figyelték meg. Ezzel összhangban membránpermeabilis foszfatáz inhibitorokkal végzett kísérletek a PP1 és PP2A katalitikus alegységek (PP1c és PP2Ac) szerepére utaltak a pRb defoszforilációjában. A PP1c és PP2Ac azonban ritkán hatnak önmagukban és elsősorban regulátor fehérjékhez kapcsolódva, holoenzim formában fejtik ki katalitikus aktivitásukat. Nem ismertek azonban azok a regulátor fehérjék, amelyek a pRb szubsztráthoz irányítják a katalitikus alegységeket.

THP-1 leukémiás sejtekben tanulmányoztuk a CLA szerepét a sejtek túlélésében. A CLA önmagában kismértékű sejtpusztulást okozott az alkalmazott 50 nM koncentrációban. Ha a sejteket a leukémia kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerrel, a citotoxikus hatású daunorubicinnel (DNR) kezeltük azok életképessége nagymértékben csökkent. Ha a DNR kezelést megelőzően a sejteket 50 nM CLA-val előkezeltük, a sejtek túlélése fokozódott. A DNR a pRb nagymértékű degradációját és defoszforilációját is indukálta. A pRb degradációja jelentősen mérséklődött CLA jelenlétében, amellyel párhuzamosan fokozódott a pRb foszforilációja. Ezek az adatok THP-1 sejtek kemoszenzitivitása és a pRb foszforilációs szintje közötti kapcsolatra utalnak és felvetik a pRb defoszforilációjában szerepet játszó foszfatáz azonosításának fontosságát.

Tanulmányoztuk a foszforilált pRb *in vitro* defoszforilációját tisztított PP1c, PP2Ac és miozin foszfatáz holoenzimrel, amely a PP1c és a miozinhoz is kötődő 130/133 kDa regulátor alegység (MYPT1) komplexéből áll. A PP1c csak kismértékben, a PP2Ac pedig gyakorlatilag nem defoszforilálja a pRb-t. Ha azonban a PP1c a MYPT1 regulátor alegységgel komplexben van jelen a defoszforiláció nagymértékben fokozódik, ami arra utal, hogy a miozin foszfatáz lehet az egyik jelölt a pRb *in vivo* defoszforilációjára. Ezt megerősítették azok az adatok is, amelyek szerint a pRb és a MYPT1 THP-1 sejtekből koprecipitálódik akár anti-MYPT1 vagy anti-pRb antitestekkel történő immunoprecipitáció, valamint a maltóz-kötő fehérjével konjugált C-terminális pRb fragmentummal (pRb-C) történő „pull-down” kísérletek során. Felületi plazmonrezonancián alapuló kötődési kísérletekben szintén igazoltuk a pRb-C és a MYPT1 stabil kölcsönhatását és a pRb-C-nek a MYPT1 N- és C-terminális fragmentumával való kölcsönhatását is kimutattuk. Specifikusan a miozin foszfatázt gátló fehérjék (P-CPI17, anti-MYPT1) alkalmazásával igazoltuk, hogy THP-1 sejtek lizátumában a pRb-t defoszforiláló aktivitás több mint 50%-a a miozin foszfatáz holoenzimnek tulajdonítható. Kimutatták azt is, hogy a CL-A kezelés során a THP-1 sejtekben a MYPT1 a Thr695 és Thr850 oldalláncokon foszforilálódik, amely foszforilációs helyek a PP1c gátlását okozzák és ez a gátlás hozzájárulhat a pRb foszforilációs szintjének növekedéséhez.

A pRb és a MYPT sejten belüli kölcsönhatását konfokális fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatok is igazolták. Kontroll és DNR-kezelt sejtekben a MYPT1 és a pRb is főképp a sejtmagban lokalizálódik. Az egyesített kép a két fehérje részleges kolokalizációját mutatta. CLA kezelés hatására a MYPT1 és a pRb is a citoplazmába transzlokálódik. Ezzel szemben CLA és DNR együttes kezeléseket követően a MYPT1 és pRb eltérő eloszlása figyelhető meg, mivel a MYPT1 a citoplazmában lokalizálódik, míg a pRb sejtmagi festődést mutat. Az eredmények azt sugallják, hogy a CLA a foszfatáz gátlásán kívül a regulátor alegység (MYPT1) transzlokációját is indukálja, ami a szubsztrátfehérje (pRb) és a „célra irányító” alegység (MYPT1) kolokalizációjának megszűnését okozva is hozzájárulhat a defoszforiláció gátlásához. Az eredmények alapján az is feltételezhető, hogy a CLA a MYPT1 foszforilációját olyan (még nem azonosított) oldalláncra indukálja, amely elősegíti a MYPT1 nukleáris exportját. Érdekes, hogy a miozin foszfatáz alkotórészei közül csak a MYPT1 transzlokálódik a citoplazmába, a PP1c megoszlása a sejtmag és a citoplazma között a kezelésekre hatására nem változik.

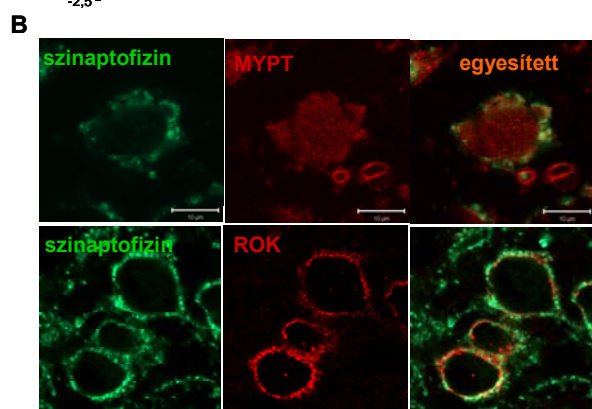
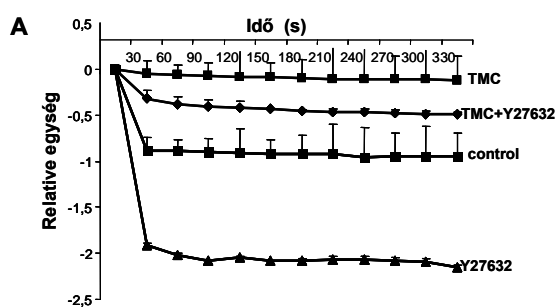
Összefoglalva: a foszfatázok gátlása CLA-val mérsékli a daunorubicin (DNR) által indukált sejthalál mértékét, amelynek hátterében a retinoblasztóma fehérje foszforilációjának fokozódása és DNR által indukált degradációjának csökkenése áll. A MP-nek jelentős szerepe lehet a pRb defoszforilációjában, amelyben a MYPT1 alegység töltheti be a PP1c-t „célra irányító” szerepet. A MP tehát a pRb defoszforilációja által részt vehet a sejtciklus és a leukémiás sejtek



kemorezisztenciájának szabályozásában is. Eredményeink a fenti folyamatok szabályozásának újszerű farmakológiai megközelítésére is felhívják a figyelmet. A pRb foszforilációs szintjének a szabályozásában eddig elsősorban a foszforilációt katalizáló ciklin/CDK komplexek szintetikus molekulákkal történő befolyásolása állt a középpontban. Jelen eredmények a defoszforilációt katalizáló foszfatázok hasonló farmakológiai szabályozási lehetőségeinek feltárására és alkalmazásának fontosságára irányítják a figyelmet (Kiss és mtsai., *Cellular Signaling*, 20: 2059-2070. (2008)).

#### 4. A neurotranszmitter felszabadulás és a fehérje foszforiláció kapcsolatának vizsgálata: a ROK és a MP szerepének tanulmányozása a neuronális fehérjék foszforilációjában.

Tanulmányoztuk, hogyan befolyásolják a PP1-et és a Rho-kinázt gátló inhibitorok az excitózist szinaptoszómákból és a neurotranszmitter felszabadulást nucleus cochlearis ventralis szeleteken.



6. ábra A, PP1c gátló TMC és ROK gátló Y27632 hatása a szinaptoszóma excitózisra FM 2-10 fluoreszcens festék szinaptoszómákból történő felszabadulásának mérésével. B, A MYPT1 és a ROK lokalizációja nucleus cochlearis ventralis szeletek pre- és posztzinaptikus sejtjein. A szinaptofizinnel történő kolokalizáció jelzi a MYPT1 és ROK preszinaptikus lokalizációját.

miozin-foszfatáz működését befolyásoló TMC és Y27632 szerekek pre-, és posztzinaptikus támadáspontja is lehet: a TMC csökkenti a neurotranszmitter tartalmazó vezikulumok exocytosisának valószínűségét, és lassítja a posztzinaptikus AMPA-receptorok deszenzitizációját, az Y27632 pedig ezzel ellentétes hatást fejt ki.

„A MYPT1 kölcsönhatása neuronális fehérjékkel” alfejezetben leírtuk, hogy a MYPT1-hez kötődő fehérjéket, amelyek valószínű MP szubsztrátként vehetők figyelembe: ilyen neuronális fehérjék, az MLC20-on kívül, a szinapszin és a szintaxin is. Foszfospecifikus antitestekkel kimutattuk, hogy a PP1 gátlása TMC-vel növeli a MYPT1 foszforilációját a Thr696 gátló helyen, a MLC20-Ser19, a szinapszin-Ser9 és a szintaxin-Ser14 oldalláncokon, míg a ROK gátló Y27632 ezzel ellentétben ezen foszforilációs helyek foszforilációs szintjét csökkentik. Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a fenti fehérjék foszforilációs szintjét a ROK/MP enzimpár szabályozza. Ezek közül a szintaxin foszforilációja negatívan befolyásolja a neurotranszmitter felszabadulást, ezért feltehető, hogy a PP1 és a ROK inhibitorok e fehérje foszforilációs szintjének változtatásán keresztül befolyásolhatják a neurotranszmissziót (Lontay és mtsai., *J. Neurochemistry*, a bírálók javaslata alapján javított kézirat beküldés előtt).

### Egyéb, a témához kapcsolódó eredmények

A pályázat céljai között szerepelt, hogy a kölcsönhatások vizsgálatára alkalmazzuk és a téma kapcsán kiszélesítsük a felszíni plazmonrezonancián alapuló méréseket (a pályázat kezdetén beüzemelt Biacore-3000 készülékkel) fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások kvantitatív jellemzésére. Amint az előző fejezetekből is kiderült, a módszert sikeresen alkalmaztuk a foszfatáz kölcsönhatások jellemzésére és a pályázathoz közvetlenül kapcsolódó témában megjelent (*Kiss és mtsai., Cellular Signaling, 20: 2059-2070. (2008)*; *Gyémánt és mtsai., Biochim. Biophys Acta 1794: 291-296 (2009)*; *Czikora és mtsai., Biochimie, 93: 1139-1145 (2011)*) és közlés alatt (*Kiss és mtsai., FEBS Journal, közlés alatt*), vagy közlés előtt lévő eredmények (ld. eNOS-MYPT1, kalcineurin-MYPT1, SNAP25-MYPT1 kölcsönhatások) ilyen típusú vizsgálatot tartalmaznak. E módszer kidolgozását segítették olyan együttműködési munkák is, amelyek a módszertani alkalmazások szempontjából kapcsolódtak a célkitűzésekhez (*Tóth és mtsai., J. Immunology, 182: 2084-2092. (2009)*; *Radnai és mtsai., J. Biol. Chem. 285: 38649-38657. (2010)*), de a kutatási téma különböző volt. Ez utóbbi okból az OTKA támogatást ezekben a közleményeken nem tüntettük fel.

E területen további módszertani alkalmazások is elindultak, így pl., kidolgoztunk egy eljárást a foszfatáz inhibitorok membrán asszociációjának a modellezésére. A membránpermeabilis inhibitorok hatásmechanizmusában fontos szerepe van a molekulák membránnal történő asszociációjának, ill. e kölcsönhatás asszociációs–disszociációs kinetikájának. A SPR elvén alapuló mérés technikák lehetőséget nyújtanak membrán asszociációs vizsgálatok kivitelezésére is. Az L1 szenzorchip dextrán mátrixhoz kovalensen kapcsolt lipofil molekulákat tartalmaz, amely képes lipid micellákat megkötni. Kísérleteink során agy-, szív- és májsejtekből kinyert liofilizált teljes lipidkivonatokat használtunk, amelyekből hidratálási és négyseri fagyasztás-felolvasztási lépés után extrúziós eljárással ~100-120 nm átmérőjű micellákat tartalmazó oldatokat készítettünk. Az oldatokat az L1 szenzorchip felületére injektáltuk és a különböző eredetű lipidek esetén megközelítőleg azonos immobilizálási mértéket (~7500 RU) állítottunk be. Kontrollként az L1 szenzorcsip lipidmentes, marhaszérum albuminnal (BSA) lefedett felülete szolgált.

Vizsgáltuk a protein foszfatáz inhibitorok (okadánsav, mikrocisztin, EGCG, ciklosporin A), valamint az endoteliális nitrogén-monoxid szintetáz (eNOS) leghatékonyabb gátlószerének (nitro-L-arginin-metil-észter, L-NAME) asszociációját a különböző szövetekből kivont lipidekkel. Az okadánsav és a ciklosporin A esetében nem tapasztaltunk számottevő asszociációs és disszociációs különbséget az eltérő lipidfelületek között. Ezzel szemben a mikrocisztin és az EGCG elsősorban a májból kivont lipidekhez mutatott nagyobb affinitást és kevésbé kötődött a szív- vagy agyszövetből kinyert lipidekhez. Az inhibitor molekulák lipidekkel történő asszociációja és disszociációja meglehetősen gyors. Ez összhangban lehet azzal a feltételezett mechanizmussal, hogy az enzimek hatásos intracelluláris gátlásához nem csak a membránnal való asszociációs készség, hanem a membránról történő viszonylag gyors disszociáció is szükséges. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a SPR technikán alapuló módszer hozzájárul különböző inhibitorok membránpermeációs sajátságainak vizsgálatához, ill. alkalmas az inhibitorok ezen tulajdonságainak összehasonlítására.

### A kutatási témával kapcsolatos PhD és TDK képzés és tudományos fokozatszerzés

A kutatási témán az OTKA témafelelős (*Dr. Erdődi Ferenc*) vezetésével 4 PhD hallgató dolgozott (*Kiss Andrea, Dedinszki Dóra, Batori Róbert és Bécsi Bálint*), közülük **Dr. Kiss Andrea** szerzett PhD fokozatot 2008-ban, a többiek fokozatszerzése 2012-ben várható. A pályázatban résztvevő *Dr. Csontos Csilla* témavezetésével a kutatási témához kapcsolódó munkával **Dr. Czikora István** szerzett PhD fokozatot 2011-ben. Intézeti kollaboráció keretében, részben a témában végzett munkával *Kolozsvári Bernadett* szerez fokozatot várhatóan 2012-ben.

A témában TDK munkát végző *Gaál Zsuzsanna* IV. éves orvostanhallgató két helyi TDK konferencián tartott előadást, majd a 2011-ben rendezett OTDK konferencián előadásával *I. helyezést* ért el.