

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Protein foszfatáz-1 és -2A enzimek szabályozása természetes eredetű polifenolokkal,
szintetizált peptidekkel és szelenoglikozidokkal**

Kónya Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Erdődi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**Protein foszfatáz-1 és -2A enzimek szabályozása természetes eredetű polifenolokkal,
szintetizált peptidekkel és szelenoglikozidokkal**

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

Írta: Kónya Zoltán okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Erdődi Ferenc

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
	Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,

Élettani Intézet könyvtára

2015. december 16, 10:00 óra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Mótyán János, PhD

Dr. Vas Virág, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok:	Dr. Gyémánt Gyöngyi, PhD
	Dr. Mótyán János, PhD
	Dr. Tantos Ágnes, PhD
	Dr. Vas Virág, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme

2019. december 12, 13:00 óra.

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek fehérjéinek legalább egyharmada foszforilálható és a foszforiláció befolyásolja azok szerkezetét és funkcióját. A fehérje foszforilációért a protein kinázok, a defoszforilációért pedig a protein foszfatázok felelősek. Először a kinázok szerepének tanulmányozására fordítottak nagyobb figyelmet, mivel a vizsgálatukat elősegíti, hogy az egyes enzim típusok, néhány kivételtől eltekintve, viszonylag kis számú fehérje foszforilációjában vesznek részt, így a specifikus gátlószerek alkalmazása lehetővé teszi az általuk szabályozott fehérjék azonosítását és a fiziológiai funkciók vizsgálatát. Azonban később kiderült, hogy a protein foszfatázoknak is fontos szerepük van a fehérjék foszforilációs szintjének kialakításában. A foszfatáz katalitikus alegységek, a kinázokkal szemben, nagyszámú szubsztrát defoszforilációját képesek katalizálni, specifitásukat általában a holoenzimben hozzájuk kapcsolódó célra irányító fehérjék szabályozzák. Ezért a katalitikus alegységekre specifikus gátlószerek alkalmazása nem teszi közvetlenül lehetővé a pontos funkciók, illetve a célfehérjék felderítését és leírását. A protein foszfatáz -1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimek széles szubsztrát spektrumuknak köszönhetően a legjelentősebb foszfoszerin/treonin (P-Ser/Thr) specifikus foszfatázok közé tartoznak. Célkitűzésünk volt, hogy az enzimek szabályozhatóságát tanulmányozzuk kisméretű molekulákkal.

A PP1c szerkezete, fiziológiai szerepe és szabályozása

Az PP1 holoenzimek aktivitásáért a protein foszfatáz -1 katalitikus alegység (PP1c) felelős. A globuláris fehérje szerkezet katalitikus centrumában Mn^{2+} és Fe^{2+} ionok koordinálódnak egy Y alakot formázó szubsztrátkötő árkok találkozási pontjában. A hidrofób, savas és C-terminális szubsztrát-kötő árkoknak a foszfofehérjék pozicionálásában van meghatározó szerepük a hatékony defoszforiláció elősegítésére. A PP1c szerkezetében többek között meghatározó még az úgynevezett $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok a katalitikus centrum közelében, amely szabályozza a katalitikus alegységek fehérjékkel és kisméretű molekulákkal kialakított kölcsönhatását.

A PP1c-fehérjét kódoló gének emlősnél 5 izoformát alakítanak ki: PP1 $\alpha 1$ és $\alpha 2$, PP1 β/δ , PP1 $\gamma 1$ és PP1 $\gamma 2$. Az izoformák számos holoenzimet alkotnak különböző regulátor fehérjékkel, amelyek kötőhelyei a PP1c felszínén hasonlóak és általában tartalmaznak egy RVxF szekvencia motívumot. Nagyszámú szabályozó fehérje ismert, ezért feltehető, hogy ezek versengenek a PP1c-hez való kötődésért. Az RVxF motívum és környezetének szerkezete

meghatározza az egyes szabályozó fehérjék affinitását a PP1c-hez, és elősegíti a másodlagos interakciós helyek kötődését is. A PP1 fiziológiás inhibitor fehérjéi (I1, I2, DARPP32, NIPP-1, CPI-17) is ismertek, amelyek a szabad katalitikus alegység, vagy akár a holoenzimek gátlásával fejtik ki szabályozó funkcióikat.

A PP1 bizonyítottan szerepet játszik számos sejt folyamat szabályozásában, mint pl. a glikogén anyagcsere, lipid metabolizmus, szinaptikus plaszticitás, sejtciklus progresszió, simaizom kontrakció, inzulin jelátvitel és a citoskeleton átrendeződés.

Alegységkölsönhatások a miozin foszfátáz holoenzimben

A PP1 számos holoenzime közül a miozin foszfátáz (MP) szerkezetét és alegység-kölsönhatásait tanulmányozták sokoldalúan. Az MP-ben a PP1c β/δ izoforma a miozin foszfátáz célra irányító alegységgel (MYPT1) képez komplexet. A MYPT1 a PP1c szubsztráthoz történő irányításában és az enzim lokalizációjában is fontos szerepet játszik. A MYPT1 tartalmaz egy RVxF konszenzus PP1c-kötő szekvenciát (KVVF), ennek jelenléte elengedhetetlen a PP1c δ -hoz való kötődés kialakításában és további kötőhelyek kapcsolódásában. A MYPT1 fehérje foszforilációja a treonin-696 (Thr696) és a treonin-853 (Thr853) oldalláncokon a PP1c-MYPT1 holoenzim foszfátáz aktivitásának gátlását eredményezi.

A MYPT1-Thr696 és a -Thr853 körül elhelyezkedő aminosavak minőségükben és sorrendjükben hasonlítanak a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyűlánc (MLC20) P-Ser19 foszforilációs helyét övező aminosavakhoz. A MYPT1 Thr696 és Thr853 foszforilációjával kialakuló gátló hatás feltehetően e foszforilált peptidszakaszok szubsztrátanalóggként történő kötődésének következménye a szubsztrátkötő árkokban.

PP2Ac szerkezete, fiziológiai szerepe és szabályozása

A PP2A katalitikus alegység (PP2Ac) aktív centrumában Mn²⁺ ionok találhatók. A PP1c izoformákkal összehasonlítva kb. 50 %-os egyezést mutatnak az aminosav sorrendben. A különbségek közül az egyik legfontosabb, hogy a β 12- β 13 hurok szerkezete eltérő. A szekvenciák átfedő szakaszai a PP1c-nél ismertetett globuláris szerkezet kialakításában vesznek részt. A PP2Ac-hez (C) egy állvány fehérje (PR/65A (A)) kapcsolódik és ez az AC dimer tekinthető a holoenzim alapszerkezetének. Az AC dimerhez B szabályozó fehérjék kötődnek, amelyek a PP2A célra irányítását és lokalizációját biztosítják. A B alegységnek négy családja ismert: PR55/B, PR56/61/B', PR48/59/72/130/B'' és PR93/110/B'''.

Ismertek a PP2A enzimek inhibitor fehérjéi is (I_1^{PP2A} (PHAP-I) és az I_2^{PP2A} (SET)), ezek funkciójukat tekintve hasonlóak a PP1-nél azonosított inhibitor fehérjékhez és specifikusan gátolják a PP2Ac-t.

A PP2A-t alkotó fehérjék posztisztetikus módosítása is jelentős az enzim szabályozásában. A különböző B alegységek Thr, tirozin (Tyr) és a Ser oldalláncokon történő foszforilációja szabályozza a holoenzim aktivitását, míg a katalitikus alegység metilációja a komplex képzésében részt vevő B, B', B'', B''' alegységek kötődésének erősségét, a partnerekhez való affinitást befolyásolhatja. A PP2A szabályozza többek között a sejtek proliferációját, a sejthalált, a sejtek mobilitását, a citoszkeleton átrendeződését, és a sejtciklus egyes lépéseit.

A PP1 és a PP2A gátlása toxinokkal és tanninokkal

A természetben számos olyan toxin található, amely eltérő mértékben gátolja a PP1 és PP2A enzimeket és ezzel segíthetik azok megkülönböztetését. Ezek a vegyületek a katalitikus centrumhoz és a szubsztrát kötő árkokban kötődve gátolják a szubsztrátokkal való kölcsönhatást és ezzel az enzimek aktivitását. A toxinok első fontosabb csoportját a polióterek képezik, amelyek közül az okadánsavat (OA) azonosították elsőként, mint protein foszfatázokat gátló toxint, amely a PP1 ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$) és PP2A ($IC_{50} = 0,1 \text{ nM}$) enzimeket *in vitro* eltérő hatékonysággal gátolta. Az OA PP1c- és PP2Ac-hez történő kötődésében az enzimek aktív centruma, a $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok és a hidrofób árok érintett. Szintén polióter kalikulin A (CLA) az OA-val szemben hatékonyabb, de kevésbé szelektív inhibitora a foszfatázoknak. A ciklikus heptapeptid toxin a mikrocisztin szintén hasonló hatékonysággal gátolja a PP1 és PP2A enzimeket ($IC_{50} = 0,2 \text{ nM}$). A poliketid típusú molekulák közül figyelmet érdemel a fostriecin, amely a katalitikus árokhoz kötődve fejti ki gátló hatását a PP2A és PP4 enzimekre a $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok közvetítésével kovalens kötést képezve egy cisztein oldallánccal. Ennek tulajdonítható, hogy a fostriecin szelektivitása a PP2A-val szemben fokozottabb a PP1c-vel összehasonlítva (PP1, $IC_{50} = 4 \text{ }\mu\text{M}$; PP2A, $IC_{50} = 40 \text{ nM}$).

A növényekben előforduló vegyületek közül a tanninok és a katechinek, mint pl. az epigallokatechin-3-gallát (EGCG) szintén gátolják a PP1c ($IC_{50} = 1,35 \text{ }\mu\text{M}$) és PP2Ac ($IC_{50} = 15 \text{ }\mu\text{M}$) aktivitását, részleges szelektivitással a PP1c iránt. A vizsgálatok alapján az EGCG a PP1c szubsztrát-kötő hidrofób árkához kötődik, amely kölcsönhatást az EGCG hidroxilcsoportjaival kialakuló hidrogénkötések is stabilizálnak. A gallotanninok között az 1,2,3,4,6-penta-O-galloil- β -D-glükóz (PGG) az EGCG-hez hasonló módon gátolja a foszfatázokat (PP1c, $IC_{50} = 0,4 \text{ }\mu\text{M}$; PP2Ac, $IC_{50} = 6,6 \text{ }\mu\text{M}$) és SPR, valamint NMR-STD adatok alapján szintén kötődik a PP1c szubsztrát-kötő hidrofób árkához.

A PP1 és a PP2A aktiválása

A PP1c aktivátorok főként a szabályozó fehérjékből származó peptidek, amelyek akadályozzák a gátló/szabályozó fehérjék kötődését az enzim felszínén, azaz deinhibitoroként működnek. Ilyen peptid pl. az izmokban található G alegység RVxF szekvenciát hordozó peptidje, ami képes a PP1c-DARPP32 gátló kölcsönhatás megszüntetésére, így a PP1c aktiválására. Érdekes, hogy a gátló mikrocisztinból származó N-acetil-Arg-Adda szerkezeti részt, valamint a D-eritro-C₁₈-ceramidot is PP1c aktivátorként azonosították.

A PP2A aktivátorai többnyire erősen hidrofób szerkezettel és/vagy olyan funkciók csoportokkal rendelkeznek, amelyek hidrogén hidak kialakítását teszik lehetővé. A ceramidok mindkét aktivátor sajátosságát hordozzák: a D-eritro-C₆-ceramid a SET (I²^{PP2A}) inhibitor fehérjéhez kötődve felszabadítja a PP2A-AC dimert az inhibitor komplexből, ezzel reaktiválva a PP2A-t. Más aktivátorok (pl. FTY720) hatása is hasonló mechanizmuson alapul.

A direkt aktivátorok közé tartozik a D-eritro-C₁₈-ceramid, a fenotiazinok és a perpenazin, amelyek a PP2A heterotrimer formáit is képesek aktiválni. A PP2A aktiválásának egy alternatív módja a PP2A inhibitor CIP2A fehérje expressziójának gátlása szintetikus kemoterápiás szerekkel (bortezomib, erlotinib) vagy a fehérje degradációjának kiváltása növényi eredetű szerekkel.

CÉLKITŰZÉSEK

A PP1 és PP2A gátlása vagy aktiválása hatást gyakorolhat számos sejt folyamatra az enzimek aktivitás változásán keresztül, mivel a Ser/Thr oldalláncon foszforilált fehérjék több, mint 90 %-ának foszforilációs szintjét befolyásolják. A foszfatázok funkcióinak feltárására azonban nincs tökéletes megoldás, mivel az inhibitorok csak mérsékelten szelektívek és már alacsonyabb alkalmazott koncentrációk mellett is citotoxikus hatásokkal bírnak. Irodalmi adatok alapján a PP1 és a PP2A enzimek gátlása számos esetben hozzájárul a sejtek malignus transzformációjához, valamint elősegítheti a daganatos sejtek túlélését. Ezzel szemben a PP1 és PP2A aktiválásának daganatellenes funkciót tulajdonítanak, elsősorban a daganatos sejtek sejthalálának indukciójában játszott szerepük által. Ezért a foszfatázok típus-specifikus gátlószereinek és aktivátorainak feltárása, lehetséges farmakológiai alkalmazásuk által, még ma is meghatározó irányvonalat képviselnek a kutatásokban. Munkacsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy egyes gallotanninok és katechinek a PP1 részlegesen szelektív gátlószerei, ezért tanulmányozni kívántuk a természetben is előforduló, szerkezetileg rokon ellagitanninok hatását a foszfatázok aktivitására és a sejtek életképességére. A MYPT1 fehérje foszforilációja a PP1c gátlását eredményezi, nem tisztázott azonban, hogy a gátló foszforilációs helyet tartalmazó peptid is befolyásolja-e a foszfatáz aktivitást. Feltételeztük, hogy a glükóz további származékai szintén befolyásolhatják a foszfatáz aktivitást, ezért tanulmányoztuk a szelenoglikozidok hatását a PP1 és PP2A aktivitására. Ezek a várttól eltérő módon aktiválták mindkét foszfatázt, ami egy előremutató felismerés volt.

Mindezek alapján kísérleteink az alábbi kérdések megválaszolására irányultak:

1. Az ellagitanninok hatásának vizsgálata a PP1 és PP2A enzimek aktivitására: típus-szelektivitás feltárása, kölcsönhatási paramétereik meghatározása és sejtes rendszereken történő vizsgálatuk.
2. Foszforilált MYPT1 peptid és PP1c kölcsönhatásának felderítése és a gátló hatás mechanizmusának tanulmányozása.
3. Szelenoglikozidok foszfatázt aktiváló hatásának vizsgálata: szerkezet-aktiváló hatás összefüggések feltárása.

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdések megválaszolásához a biokémiai, sejt-és molekuláris biológiai technikák széles körét alkalmaztuk.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Foszfatázok preparálása és a foszfataz aktivitás meghatározása

Natív PP1c és PP2Ac preparátumot nyúl vázizomból, rekombináns rPP1ca és rPP1cδ enzimeket bakteriális expressziós rendszerekből izoláltuk és tisztítottuk. A tisztított preparátumok, valamint HeLa sejtizátumok foszfataz aktivitását ^{32}P -MLC20 szubsztráttal határoztuk meg az effektorok (ellagitanninok, szelenoglikozidok, P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹) jelenlétében és távollétében 30°C-on a felszabaduló $^{32}\text{P}_i$ radioaktivitásának folyadékszintillációs készülékben történő mérésével.

Sejtenyésztés, sejtkelések, életképesség meghatározás

A HeLa sejteket a forgalmazó által megadott útmutatások alapján tartottuk fenn. A szérum éheztetést követően a médiumot a vegyületeket tartalmazó tenyésztő oldatra cseréltük, majd a tenyészeteket sejtenyésztő inkubátorba helyeztük 24 órára (30 °C, 80% páratartalom). Az inkubációt követően a kezelési közeget lecseréltük szérummentes tenyésztési médiumra és Alamar esszével meghatároztuk a sejtek életképességét.

Felületi plazmon rezonancia (SPR)

A szelenoglikozidok és a 2,3-di-O-galloil-4,6-O-(S)-hexahidroxidifenil-β-D-glükóz (tellimagrandin I) rPP1cδ-val kialakuló kölcsönhatását Biacore 3000 készülékkel felületi plazmon rezonancián alapuló kötődési módszerrel vizsgáltuk. A szelenoglikozidok PP1c-vel való kölcsönhatását a rPP1cδ-GST-MYPT1 komplex képződésére gyakorolt hatásukon keresztül tanulmányoztuk. Anti-GST antitestet kovalensen kapcsoltunk CM5 szenzorchip felszínre, amin kapcsolási kit segítségével a gyártó ajánlása szerint. Az anti-GST-t tartalmazó felszínre GST-vagy GST-MYPT1 fehérjét immobilizáltunk. Ezt követően 3 μM rPP1cδ fehérjét áramoltattunk a szenzor felszínének felett szelenoglikozidok jelenlétében (0-50 μM) vagy távollétében (asszociációs fázis), amit az alkalmazott pufferrel történő mosás (disszociációs fázis) követett. A GST kontroll felszín a GST-MYPT1 felszínnel azonos módon lett kezelve a kísérlet során, így a GST-MYPT1 szenzor felszínén mértből kivonva a GST felszínen kapott rezonanciajelet a PP1c specifikus kötődését, ill. a szelenoglikozidok jelenlétében ennek gátlására jellemző adatokat kaptuk. A tellimagrandin I interakciójának vizsgálatánál a rPP1cδ -t CM5 szenzor felülethez kapcsoltuk korábban leírt eljárást alkalmazva. A tellimagrandin I-et 0,5-2,5 μM koncentrációban áramoltattuk a kontroll és az rPP1cδ kapcsolt felszínének felett. A kölcsönhatás asszociációs fázisát 7, míg a disszociációs fázisát 6 percen keresztül követtük. Az analit kötődését a felszínhez

rezonanciajelként (RU) regisztráltuk az idő (s) függvényében. A rPP1cδ felszíneken kapott rezonanciajelekből levonva a kontroll felszínen mért rezonanciajelet a PP1c-tellimagrandin I kölcsönhatást jellemző szenzogramokat nyertünk. A szenzogramokból a kölcsönhatást jellemző kinetikai és asszociációs/disszociációs paramétereket a BiaEvaluation 3.1 szoftver (Biacore AB, Uppsala, Sweden) segítségével határoztuk meg 1 : 1 kölcsönhatási sztöchiometriát feltételezve.

Izoterm titrációs kalorimetria (ITC)

A rPP1α fehérjét a méréshez használt pufferben történő dialízist követően a MicroCal ITC200 készülék mérőcellájába töltöttük (5-10 μM), a referencia cellát pedig a pufferrel töltöttük fel. A 60-100 μM tellimagrandin I-et automata fecskendővel adagoltunk a mérőcellába 18 lépésben 2 μl térfogatokban 25 °C-on, kevertetés mellett, 5 μcal/s kompenzációs energia beállítás mellett. A titrálási adatokat Microcal ITC-Origin szoftver segítségével egy kötőhelyes kötődési modellt feltételezve elemeztük.

Mikroskálás termoforézis (MST)

A mikroskálás termoforézis méréseket a Monolith NT.115 és a Monolith NT.LabelFree műszerek segítségével végeztük. A jelölés nélküli méréseket a Monolith NT-LabelFree segítségével 250 nM rPP1α jelenlétében kiviteleztük, míg a Monolith NT.115 műszer esetében NT-647 fluoreszcens festékkel jelzett 170 nM rPP1α oldattal végeztük. A kölcsönható ligandumokat a rPP1α fehérje oldatával hígítottuk úgy, hogy a ligandumok koncentrációja 7,32 nM -120 μM (polifenolok), vagy 61 nM -1 mM (P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid) tartományba essen. A mintákat üveg kapillárisokban töltve a kötődések hatására a termoforézis során bekövetkező belső (NT.LabelFree) vagy a fehérjéhez kapcsolt molekula (NT.115) fluoreszcencia intenzitás változást detektáltuk. Az adatokat MO AffinityAnalysis szoftver (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Németország) segítségével analizáltuk.

NMR telítési átvitel differencia (NMR-STD)

Az NMR telítési átvitel differencia (NMR-STD) kísérleteket Bruker Avance II 500 spektrométerrel végeztük korábban közölt módszert alkalmazva. Tellimagrandin I-et D₂O foszfát pufferben oldottuk (1,2 mM) és a molekula ¹H-NMR spektrumát rPP1c (10-13 μM) jelenlétében és távollétében meghatározva nyertük a telítési átviteli differencia (STD) spektrumot 293 K hőmérsékleten.

Dokkolási szimulációk

A PP1c-szelenoglikozid dokkolási kísérletekhez a rPP1c-nek egy az RVxF motívumot tartalmazó peptiddel alkotott komplexéből származó röntgenkrisztallográfiás szerkezete szolgált alapul. A kötődő peptid RVxF motívumának kötőfelszíne szolgált referenciaként a felületi dokkolási kísérletekhez. Egy 25 x 25 x 25 Å kockában az Autodock Vina programot alkalmaztuk a dokkolás számításainak kivitelezéséhez, és a legnagyobb affinitást mutató szerkezeteket vetettük alá további analízisnek. A kísérletek során feltárt hidrofób interakciós felületeket MGL Tools segítségével vizsgáltuk. A szerkezetek vizualizációját és további elemzését az UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (NIGMS P41-GM103311)) program segítségével végeztük el.

Szinaptoszóma preparálás és exocitózis vizsgálatok

A szinaptoszómákat C3H egér cerebrális kortexéből preparáltuk korábban közölt eljárás alapján. A kortexek szövetét homogenizáló pufferben vettük fel és homogenizálást követően differenciál és gradiens centrifugálási eljárásokkal nyertük a szinaptoszóma preparátumot. A szinaptoszómákat Krebs pufferben vettük fel úgy, hogy 1,2 mM végkoncentrációban CaCl_2 -t adtunk hozzá, majd tellimagrandin I, 1,4,5-tri-O-galloil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glükóz (mahtabin A, 1, 10, 100 μM) vagy tautomycin (TMC, 10 μM) jelenlétében, illetve ezek távollétében inkubáltuk 45 percen keresztül 30 °C-on. A mintákat ezt követően vagy exocitózis esszének vetettük alá, vagy RIPA pufferben végzett lízist követően Western blot analízissel vizsgáltuk a célfehérje, a SNAP-25 mennyiségét és foszforilációs szintjét.

Az exocitózis esszét egy korábban közölt protokoll alapján kiviteleztük. A szinaptoszómákat FM 2-10 festékkel töltöttük fel, majd az exocitózist 30 mM KCl hozzáadásával indukáltuk és a kezelések hatására bekövetkező FM 2-10 festék fluoreszcencia változását (negatív korreláció az exocitózis mértékével arányosan) detektáltuk Fluoroskan FL műszerrel.

A Western blot analízishez a feltárt minták fehérje tartalmát BCA fehérje mérési kit segítségével határoztuk meg. A szinaptoszóma preparátumok fehérjéit SDS-PAGE módszerrel választottuk el, majd a gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat blokkoltuk. Az elsődleges antitestet 16 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk, majd mosást követően a mintákat torma peroxidáz enzimmal konjugált másodlagos antitest oldatával inkubáltuk a membránon. Az újabb mosás után az antigén-antitest kölcsönhatásokat kemilumineszcenciás reagenssel detektáltuk Chemidock Touch műszerrel. A kapott jeleket denzitometráltuk és Fiji (Image J) programmal értékeltük.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az ellagitanninok PP1c-re és PP2Ac-ra gyakorolt szabályozó hatása

Az ellagitanninok gátolják a PP1c és PP2Ac enzimeket nagyobb szelektivitást mutatva a PP1c enzimmel szemben, a PP2A-val összehasonlítva. Kutatócsoportunk korábban a catechin EGCG és a szerkezetileg rokon gallotannin PGG vizsgálatánál hasonló eredményeket kapott, de a vegyületek szelektivitása kisebb mértékű volt. Ennek hátterében szerkezetből adódó eltérések állhatnak. A kísérletekben vizsgált ellagitanninok abban különböznek a PGG-től, hogy kovalensen kapcsolt, hexahidroxidifenil csoportot tartalmaznak, illetve a galluszsav csoportok eltérő pozícióban és számban észtereszítik a központi β -D-glükóz hidroxil-csoportjait: az 1,2-di-O-galloil-4,6-O-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glükóz (GHG) szabad alkoholos hidroxil csoportot tartalmaz, míg a tellimagrandin I, a 2,3; 4,6-di-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glükóz (pedunculagin) és a 4,5-di-O-galloil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glükóz (praecoxin B) szabad glikozidos hidroxil-csoportot tartalmaz.

A tellimagrandin I molekula szerkezetének forgási szabadsági foka alacsonyabb, mint a PGG molekulának a 4,6-hexahidroxidifenil csoportnak köszönhetően, így a szerkezete merevebb és a PP1c aktivitását is hatékonyabban gátolja. A mahtabin A, amelynek a glikozidos hidroxilcsoportja is galluszsavval észtereszített, gyengébb gátló hatást fejt ki a PP1c-re, viszont 2,3- pozícióban tartalmazza a hexahidroxidifenil csoportot, ami a tellimagrandin I-től eltér, ezért a glikozidos galluszsav észter szerepe a gátló hatásban nem egyértelmű. Ha összevetjük a tellimagrandin I és a praecoxin B szerkezetét a tapasztalt gátlásokkal, látható, hogy a hexahidroxidifenil pozíciója befolyásolja a gátlás mértékét.

A tellimagrandin I és a GHG szerkezete hasonló módon 4,6- hexahidroxidifenil csoportot tartalmaz, a GHG glikozidos hidroxil csoportja viszont galluszsavval van észtereszítve és a 3. pozícióban szabad alkoholos hidroxil csoportot tartalmaz. A GHG kevésbé hatásos inhibitor, mint a tellimagrandin I vagy a praecoxin B. A szerkezet 3. pozícióban található galluszsav észternek, függetlenül attól, hogy szabadon vagy a hexahidroxidifenil csoport részeként szerepel, fontos szerepe lehet a gátlás kialakulásában, míg a glikozidos hidroxilcsoport galluszsav észtere kevésbé tűnik meghatározó szerkezeti elemnek. A pedunculaginban két hexahidroxidifenil csoport található, ennek a molekulának az inhibitor hatékonysága viszont a többi molekulához képest kisebb és feltehetően ezért a molekula túlzott merevsége okolható.

Az ellagitanninok a PP1c-t a PGG-hez hasonló mértékben gátolják, a PP2Ac-re kifejtett hatásuk viszont mérsékeltebb. Ez a különbség az IC_{50} értékekből számított szelektivitási arányokban is tükröződik (PP1c/PP2Ac= 1: 80/97 az ellagitanninokra és 1: 17 PGG-re). Korábban

a PP2Ac röntgenkristallográfiás szerkezetéből származó modell alapján EGCG-vel alkotott komplexére elvégzett molekuladinamikai szimulációk arra utaltak, hogy az EGCG a PP2Ac-ben és a PP1c-ben eltérő pozícióban kötődhet, valamint az EGCG kötődését a szubsztrátkötő árokhoz a PP2Ac-ben az árok közelében lévő sóhíd korlátozhatja. Mivel az ellagitanninok szintén a hidrofób szubsztrát kötő árokhoz kapcsolódnak, a kötődésüket a méretük mellett a PP2A szerkezetében található sóhíd is befolyásolhatja.

Az NMR-STD analízissel feltárt eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az ellagitanninok aromás gyűrűinek hidrofóbicitása a PP1c-vel történő kölcsönhatás fontos tényezője. Korábbi kísérletek megerősítették, hogy az EGCG esetén a gyűrűhöz kapcsolódó hidroxilcsoportok hidrogén kötést alakítanak ki a PP1c-vel, stabilizálva az interakciót. A hidroxilcsoportok szerepét nem erősítettük meg a kölcsönhatásban az ellagitanninok vizsgálatánál, de irodalmi adatok alapján ismert, hogy a polifenolok hidroxilcsoportjai hidrogénkötésekkel részt vesznek a fehérjékhez való kötődésükben.

A tellimagrandin I-PP1c kölcsönhatását több kísérleti módszerrel vizsgáltuk meg. NMR-STD módszerrel kimutattuk a kötődést és annak hidrofób jellegét, ITC, SPR és MST módszerek segítségével pedig kvantitatív módon jellemeztük a kölcsönhatást. A kapott K_D értékek a módszertől függő módon 0,23 és 1,78 μM közötti értékek voltak, amelyek jó egyezést mutattak a gátlást jellemző IC_{50} értékekkel. Korábban a PGG és az EGCG PP1c-vel kivitelezett SPR vizsgálata során felmerült, hogy a molekulák, habár csak egy kötőhellyel rendelkeztek, de 1:1 kötődési aránytól jóval nagyobb mértékben kötődnek az immobilizált PP1c felszínéhez. Ez a „stacking” jelenség, amely a polifenol molekulák egymással történő kölcsönhatását feltételezi, nem zárható ki az ellagitanninok esetén sem és nem csak az SPR, de a további kötődési módszerek (ITC, MST) esetén is befolyásolhatja a K_D értékét.

A tellimagrandin I csökkentette a HeLa sejtek életképességét, valamint a sejtek foszfatáz aktivitását. Ezzel szemben a mahtabin A hatástalannak bizonyult a sejtes kísérletekben. A különbségek hátterében a tellimagrandin I és a mahtabin A eltérő membrán-permeabilitása állhat. Azt, hogy a permeabilitási különbség két szerkezetileg hasonló molekula között hogyan jön létre HeLa sejteken a kísérleteink alapján nem tudjuk megválaszolni. A mahtabin A növelte az egér kortikális szinaptoszómáiban a SNAP-25^{Thr138} foszforiláció szintjét, és csökkentette a KCl által kiváltott exocitózis mértékét, míg a tellimagrandin I hatástalan volt.

Összességében az ellagitanninok a PP1 és PP2A inhibitorok új családját képviselik a PP1 felé mutatott fokozottabb gátlási preferenciával. A kvantitatív kötődési vizsgálatok közepes stabilitású kölcsönhatást mutattak ki a PP1c és a tellimagrandin I között, ami a PP1c hidrofób

szubsztrát-kötő árkával a tellimagrandin I aromás gyűrűinek, valamint a fenolos hidroxil csoportok által kialakított hidrogén kötések révén alakul ki.

A MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ és a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása PP1-re

Megvizsgáltuk a miozin foszfatáz regulátor alegységéből (MYPT1) származó foszforilált peptid PP1c-t gátló sajátságait. A P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid gátolta a PP1c aktivitását ($IC_{50} = 32 \mu M$), azonban a viszonylag magas IC_{50} érték miatt ez a peptid nem vehető számításba igazán ígéretes foszfatázgátló molekulaként.

Az NMR-STD adatok a PP1c-P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ komplex elemzésével két új felismeréshez vezettek. Egyrészt megerősítették azt a feltételezést, hogy a peptidnek a PP1c-vel való interakciójában a hidrofób és bázikus szekvenciáinak van szerepe, összhangban azzal, hogy ezek az aminosav oldalláncok a PP1c hidrofób és savas szubsztrát-kötő árkaival lépnek kölcsönhatásba. Másrészt igazolódott, hogy a PP1c ($10-14 \mu M$) és a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ ($1,3 \text{ mM}$) ilyen magas koncentrációjánál az NMR kísérletek alatt a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ defoszforilálódik, magas felezési idővel ($t_{1/2} = 82$ perc). Az NMR-STD mérések a defoszforilált peptiddel is igazolták a kölcsönhatást, de az mikroskálás termoforézis (MST) módszerrel nem volt kimutatható, ami a defoszforilált peptid és a PP1c közötti gyenge kölcsönhatásra utal. A foszforilálatlan peptid viszont nem rendelkezik gátló hatással, ami a foszfortreonin jelenlétének szükségességét feltételezi a gátlás kialakulásához.

A P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ defoszforilációjának jelentős idő igénye arra utal, hogy a peptid gátló hatását úgy fejt ki, hogy a PP1c “rossz szubsztrátja”, viszont a fiziológias szubsztrátokhoz hasonló erősséggel kötődik az enzimhez versengve a szubsztráttal a defoszforilációs folyamatban. Ez a jelenséget egy közelmúltban megjelent közleményben “unfair” kompetíciónak nevezték el. Jelenleg folyamatban lévő molekuláris dokkolási szimulációk arra utalnak, hogy a peptid valóban szubsztrát analóggként viselkedik, viszont a foszfortreonin pozíciója kedvezőtlen a defoszforiláció szempontjából és kötődése megváltoztatja a fémionok koordinációját is.

Összefoglalva: a regulátor fehérjéből származó rövid peptidek nem igazán hatékony gátlószerei a PP1c-nek, de a hatásuk elemzése, és a további szerkezeti vizsgálatok érdekes adatokkal szolgálhatnak a gátló mechanizmusra, és segíthetik hatékonyabb gátló peptidek tervezését is.

PP1 és PP2A szabályozása szelenoglikozidokkal

Az acetilált aromás szelenoglikozidok szerkezet függő módon aktiválták a PP1c és a PP2Ac enzimeket. Az aktiválásban szerepe lehet a vegyületek hidrofóbicitásának, mivel csak az

acetilált szelenoglikozidok voltak serkentő hatásúak. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy a vegyületek nem a szubsztrát-kötő hidrofób árokhhoz kötődnek az enzim felszínén, hanem a PP1c-hez kapcsolódó regulátor és inhibitor fehérjékben megtalálható RVxF motívum megkötésében részt vevő felszínhez. A molekula dokkolási kísérletek eredményei alapján a szelenoglikozidok és a motívum PP1c-vel kialakított interakciójában fontos hidrofób aminosavak (Val és Phe) kötőfelszínének átfedése csak részleges. SPR kötődési kísérleteink arra utalnak, hogy a motívumot tartalmazó peptidek/fehérjék és a szelenoglikozidok kölcsönösen gyengítik egymás kötődését, de nem szüntetik meg teljesen.

A szelenoglikozidok jelenlétében csökken az RVxF motívumot tartalmazó MYPT1 szabályozó fehérje kötődésének mértéke a PP1c-hez, de a szelenoglikozidok telítési koncentrációinál is megfigyelhető a PP1c-MYPT1 komplex képződése. Ezért feltételezzük egy PP1c-szelenoglikozid-MYPT1 komplex kialakulását, ahol a partnerek gyengébben kötődnek a PP1c-hez, de az asszociációjuk nem teljesen gátolt. Ezt a feltételezést megerősítik azon eredményeink is, hogy a szelenoglikozidok, igaz kismértékben, de növelik a HeLa sejtek foszfatáz aktivitását is, ahol PP1 és PP2A holoenzimek vannak jelen.

Munkánk során feltártunk egy olyan vegyületcsaládot, amely a foszfatázok mindkét tanulmányozott típusát képesek aktiválni. Azonban a szelenoglikozidok nem igazán tekinthetők farmakológiai releváns foszfatáz aktivátoroknak, mivel intracelluláris hatásuk mérsékelt, emellett citotoxikusak acetilált és nem acetilált formában is. A szelenoglikozidok acetilálástól függetlenül csökkentették a HeLa sejtek életképességét, ami pedig arra utal, hogy a foszfatáz aktiválásnak csak legfeljebb részleges szerepe lehet a szelenoglikozidok sejthalált indukáló hatásában, mivel az acetilált vegyületek nagyobb mértékű sejthalált idéztek elő. Mindezek ellenére a szelenoglikozidok molekuláris templátként szolgálhatnak új foszfatáz aktivátor molekulák szintéziséhez, amik a fenti hiányosságokat kiküszöbölik. Ilyen vegyületek felderítését az is indokolná, hogy a protein foszfatázokat ma már tumor szupresszor fehérjéknek tekintik, amelyek aktivációja elősegítheti a daganatos sejtek életképességének csökkentését. A kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a PP2Ac felszínén legalább két hidrofób kötőhely is található az aktivátor molekulák megkötéséhez, amelyek szerkezete azonban nagy valószínűséggel eltér a PP1c kötőfelszínétől.

ÖSSZEFOGLALÁS

A protein foszfatázok és kinázok összehangolt működése a sejtszintű folyamatok szabályozásában fontos szerepet játszik. A protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) a foszfatáz enzimes család fontos képviselői, a foszfoszerin/treonin (P-Ser/Thr) fehérjék több mint 90 %-ának defoszforilációját végzik, ezzel számos sejtanyagcserét szabályoznak. Célkitűzésünk a PP1 és PP2A enzimek új inhibitor és aktivátor molekuláinak azonosítása, és ezek gátló/aktiváló mechanizmusának feltárása volt.

Kimutattuk, hogy az ellagitanninok gátolják a PP1-et és PP2A-t, részleges szelektivitást mutatva a PP1-el szemben. Jellemeztük a PP1 katalitikus alegység (PP1c) és a leghatékonyabb gátlószer, a tellimagrandin I kölcsönhatását NMR telítési átviteli differencia (NMR-STD) spektroszkópiával. Meghatároztuk az interakció kvantitatív sajátosságait ($K_D = 0,23-1,78 \mu M$) felületi plazmon rezonancián (SPR), izoterm titrációs kalorimetrián (ITC) és mikroszkálás termoforézisen (MST) alapuló kötődési módszerekkel. A tellimagrandin I gátolta a HeLa sejtek foszfatáz aktivitását és csökkentette azok életképességét, míg a mahtabin A növelte a neuronális fehérjék foszforilációját és egyidejűleg csökkentette az exocitózis mértékét kortikális szinaptoszómákban. Ezek az adatok arra utaltak, hogy az ellagitanninok foszfatázgátló sajátosságuk által sejtanyagcserét szabályozásában is részt vehetnek.

A miozin foszfatáz regulátor alegység foszfatázgátló szekvenciája alapján szintetizált foszfopeptid (P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹) gátolta ($IC_{50} = 32 \mu M$) a PP1c aktivitását. A peptid gátló hatása a P-Thr oldallánc lassú defoszforilációjának és ezzel a fiziológiás szubsztrátokkal történő egyenlőtlen („unfair”) kompetíciónak tulajdonítható, amelynek szerkezeti hátterében a foszfortreonin és foszfoszerin defoszforiláció szempontjából eltérő pozíciója állhat a katalitikus centrumban.

Az acetilált szelenoglikozidokat a PP1 és a PP2A enzimek szerkezet-függő aktivátoraiként ($EC_{50} = 80-300 \mu M$) azonosítottuk. Kompetíciós kinetikai és SPR kötődési módszerekkel kimutattuk, hogy a szelenoglikozidok kötőhelye a PP1c felületén részlegesen átfed a regulátor alegységekben található, a kölcsönhatáshoz esszenciális RVxF szekvencia motívum kötőfelszínével. A szelenoglikozidok, a HeLa sejtek foszfatáz aktivitásának kismértékű, de szignifikáns növekedését okozták és csökkentették a sejtek életképességét, ami legalább is részben, a foszfatáz aktiválásnak is tulajdonítható.

Összefoglalva, az ellagitanninokat és a szelenoglikozidokat, mint a foszfatáz szabályozó molekulák új családját azonosítottuk. Ezek a molekulák templátként szolgálhatnak új, farmakológiai jelentőségű szabályozó molekulák szintéziséhez.

PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/300/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kónya Zoltán
Neptun kód: MN0FM4
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kónya, Z.**, Bécsi, B., Kiss, A., Horváth, D., Hadháziné Raics, M., Kövér, K. E., Lontay, B., Erdődi, F.: Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A by ellagitannins: structure-inhibitory potency relationships and influences on cellular systems.
J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 34 (1), 500-509, 2019.
IF: 4.027 (2018)
2. **Kónya, Z.**, Bécsi, B., Kiss, A., Tamás, I., Lontay, B., Szilágyi, L., Kövér, K. E., Erdődi, F.: Aralkyl selenoglycosides and related selenosugars in acetylated form activate protein phosphatase-1 and -2A.
Bioorg. Med. Chem. 26 (8), 1875-1884, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.039>
IF: 2.802

További közlemények

3. Szabó, K., **Kónya, Z.**, Erdődi, F., Farkas, I., Dombrádi, V.: Dissection of the regulatory role for the N-terminal domain in *Candida albicans* protein phosphatase Z1.
PLoS One. 14 (2), 1-27, 2019.
IF: 2.776 (2018)
4. Bekéné Debreceni, I., Szász, R., **Kónya, Z.**, Erdődi, F., Kiss, F., Kappelmayer, J.: L-Selectin Expression Is Influenced by Phosphatase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia.
Cytom. Part B-Clin. Cytom. 96 (2), 149-157, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21771>
IF: 2.938 (2018)





5. Garda, T., Kónya, Z., Freytag, C., Erdődi, F., Gonda, S., Vasas, G., Szűcs, B., Mikóné Hamvas, M., Kiss-Szikszai, A., Vámosi, G., Máthé, C.: Allyl-isothiocyanate and microcystin-LR reveal the protein phosphatase mediated regulation of metaphase-anaphase transition in *Vicia faba*. *Front. Plant Sci.* 9, 1-15, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01823>
IF: 4.106
6. Horváth, D., Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., Bátor, R. K., Dedinszki, D., Szőlősi, A. G., Tamás, I., Iván, J., Kiss, A., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* 1864 (10), 3268-3280, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2018.07.013>
IF: 4.328
7. Bátor, R. K., Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedűs, C., Bordán, Z., Verin, A., Lontay, B., Erdődi, F.: Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci Rep.* 7 (44698), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44698>
IF: 4.122
8. Petrényi, K., Molero, C., Kónya, Z., Erdődi, F., Ariño, J., Dombrádi, V.: Analysis of Two Putative *Candida albicans* Phosphoantigenic Cysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles. *PLoS One.* 11 (8), e0160965, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160965>
IF: 2.806
9. Garda, T., Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., Riba, M., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *J. Plant Physiol.* 199, 1-11, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>
IF: 3.121
10. Chen, E., Choy, M. S., Petrényi, K., Kónya, Z., Erdődi, F., Dombrádi, V., Peti, W., Page, R.: Molecular Insights into the Fungus-Specific Serine/Threonine Protein Phosphatase Z1 in *Candida albicans*. *mBio.* 7 (4), e00872-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00872-16>
IF: 6.956





11. Kengyel, A., Bécsi, B., **Kónya, Z.**, Sellers, J. R., Erdődi, F., Nyitrai, M.: Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity.
Eur. Biophys. J. 44 (4), 207-218, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-015-1015-z>
IF: 1.444
12. Dedinszki, D., Sipos, A., Kiss, A., Bátor, R. K., **Kónya, Z.**, Virág, L., Erdődi, F., Lontay, B.: Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1852 (1), 22-33, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2014.11.005>
IF: 5.158
13. Beyer, D., Tándor, I., **Kónya, Z.**, Bátor, R. K., Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., Vasas, G., Mikóné Hamvas, M., Jambrovics, K., Máthé, C.: Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*.
Ann. Bot. 110 (4), 797-808, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs154>
IF: 3.449
14. Demeter, Z., Surányi, G., Molnár, V. A., Sramkó, G., Beyer, D., **Kónya, Z.**, Vasas, G., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*.
PCTOC. 100, 349-353, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-009-9645-4>
IF: 1.243

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 49,276

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
6,829

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.08.26.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 számú „A gyógyszerkutatás újabb irányai: peptid-fehérje kölcsönhatások a magasabb rendű fehérjeszerveződések szabályozásában - PHARMPROT teaming” című projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.