

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Kónya Zoltán

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
BEVEZETÉS	8
IRODALMI BEVEZETÉS.....	8
FOSZFOSZERIN/TREONIN (P-SER/THR) SPECIFIKUS FOSZFATÁZOK.....	8
FOSZFOPROTEIN FOSZFATÁZOK (PPP)	10
PP1 ÉS A PP2A ENZIMEK	10
A PP1C SZERKEZETE, FIZIOLÓGIAI SZEREPE ÉS SZABÁLYOZÁSA	11
A MYPT1 SZERKEZETE ÉS SZEREPE A MP KIALAKÍTÁSÁBAN.....	12
PP2AC SZERKEZETE, FIZIOLÓGIAI SZEREPE ÉS SZABÁLYOZÁSA	14
A PP1 ÉS A PP2A GÁTLÁSA TOXINOKKAL	15
A PP1 ÉS PP2A GÁTLÁSA TANNINOKKAL.....	16
A PP1 AKTIVÁLÁSA.....	18
A PP2A AKTIVÁLÁSA	18
CÉLKITŰZÉSEK	19
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
ANYAGOK.....	20
VEGYÜLETEK.....	20
FEHÉRJÉK	20
FOSZFATÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA <i>IN VITRO</i>	21
SEJT TENYÉSZTÉS ÉS SEJTKEZELÉSEK: ÉLETKÉPESSÉG ÉS FOSZFATÁZ AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA.....	21
FELÜLETI PLAZMON REZONANCIA (SPR).....	22
IZOTERM TITRÁCIÓS KALORIMETRIA (ITC).....	23
MIKROSKÁLÁS TERMOFORÉZIS (MST)	23
NMR TELÍTÉSI ÁTVITEL DIFFERENCIA (NMR-STD).....	24
DOKKOLÁSI SZIMULÁCIÓK.....	24
SZINAPTOSZÓMA PREPARÁLÁS ÉS EXOCITÓZIS VIZSGÁLATOK	25
STATISZTIKAI ANALÍZIS	26
EREDMÉNYEK.....	27
AZ ELLAGITANNINOK HATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA A PP1 ÉS PP2A ENZIMEK AKTIVITÁSÁRA: TÍPUS-SZELEKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA, KÖLCSÖNHATÁSOK KVANTIFIKÁLÁSA ÉS SEJTES RENDSZEREKEN TÖRTÉNŐ VIZSGÁLATUK	27
<i>Ellagitanninok hatásának vizsgálata PP1c és PP2Ac aktivitására</i>	<i>27</i>
<i>Polifenolok interakciója PP1c-vel</i>	<i>31</i>
<i>Az ellagitanninok hatása sejtes rendszerekre</i>	<i>33</i>
FOSZFORILÁLT MYPT1 PEPTID ÉS PP1C KÖLCSÖNHATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA ÉS A GÁTLÓ MECHANIZMUSOK FELTÁRÁSA	35

<i>A MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása a PP1c aktivitására</i>	<i>36</i>
SZELENOGLIKOZIDOK FOSZFATÁZT AKTIVÁLÓ HATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA: SZERKEZET- AKTIVÁLÓ HATÁS ÖSSZEFÜGGÉSEK MEGHATÁROZÁSA.	41
<i>A szelenoglikozidok hatásának vizsgálata PP1c és PP2Ac aktivitására</i>	<i>41</i>
<i>Kompetíció a szelenoglikozidok és az RVxF PP1c-kötő motívumot tartalmazó peptid között a PP1c-hez való kötődésben</i>	<i>45</i>
<i>A szelenoglikozid-PP1c interakció modellezése molekula dokkolással.....</i>	<i>47</i>
<i>A szelenoglikozidok hatása HeLa sejtek életképességére és foszfatáz aktivitására.....</i>	<i>49</i>
EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	52
<i>A PP1 és PP2A SZABÁLYOZÁSA ELLAGITANNINOKKAL</i>	<i>52</i>
<i>A MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ ÉS A P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ PEPTIDEK HATÁSA PP1C-RE</i>	<i>54</i>
<i>A PP1 és PP2A SZABÁLYOZÁSA SZELENOGLIKOZIDOKKAL</i>	<i>56</i>
ÖSSZEFOGLALÁS.....	58
SUMMARY.....	59
IRODALOMJEGYZÉK	60
TÁRGYSZAVAK.....	70
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	71
PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	72
FÜGGELÉK	75

Rövidítések jegyzéke

³² P-MLC20	³² P jelölt 20 kDa púlyka zúza simaizom könnyű lánc fehérje
67LR	67 kDa lamin receptor
Adda	MCY-LR heptapeptid aril dién
ANOVA	varianciaanalízis
BASG	benzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
BOASG	1-szelenobenzoil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glükopiranóz
Br-BASG	4-bromobenzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
BSA	borjú szérum albumin
BSG	benzil 1-szeleno-β-D-glükopiranóz
CIP2A	tumor indukált PP2A inhibitor fehérje
CLA	kalikulin-A
Cl-BOASG	1-szeleno-(4-kloro-benzoil) 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glükopiranóz
CPI-17	C-kináz foszforilált 17 kDa méretű protein foszfatáz-1 inhibitor fehérje
Cys	cisztein
DARPP32	dopamin és cAMP szabályozott neuronális foszfoprotein
DNO ₂ -PASG	2,4-dinitro-fenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
DNS	deoxiribonukleinsav
DTT	ditiotreitol
EC ₅₀	A félmaximális aktivációhoz szükséges koncentráció
EDC	1-etil-3-(dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGCG	epigallokatechin-3-gallát
FCP/SCP	aszpartát foszfatázok
FLAG-MYPT1	flag peptid konjugált MYPT1
FM 2-10	(N-(3-trietilammóniumpropil) -4-(4-(diethylamino) sztilil) piridínium-dibromid
FTY-720	fingolimod, Myriocin homológ szfingozin-1 receptor modulátor molekula
GBPI	bél és agy specifikus foszfatáz inhibitor
GHG	1,2-di-O-galloil-4,6-O-(S)-hexahidroxidifenil-β-D-glükóz
G _M	izom glikogén-kötő regulátor alegység
GST	glutation-S-transzferáz
GST-MYPT1	glutation-S-transzferáz konjugált MYPT1
I1	inhibitor-1

I2	inhibitor-2
IC ₅₀	A félmaximális gátláshoz szükséges koncentráció.
ITC	izoterm titrációs kalorimetria
KEPI	protein kináz C aktivált inhibitor fehérje
M20/21	a miozin foszfatáz 20/21 kDa szabályozó alegysége
M-ADBOASG	1-szeleno-(4-metilbenzoi)-2-acetamido-2-deoxi-3,4,6-tri-O-acetil-β-D-glükopiranóz
mahtabin A	1,4,5-tri-O-galloil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenil-β-D-glükóz
M-BOASG	1-szeleno-(4-metilbenzoi)-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glükopiranóz
MCY-LR	mikrocisztin-LR
MEM	minimum eszenciális médium
MEM L-Gln	minimum eszenciális médium 2 mM L-glutammal
MLC20	20 kDa miozin könnyű lánc
MLCP	miozin könnyű lánc foszfatáz
MO-BASG	4-metoxibenzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
MP	miozin foszfatáz
MST	mikroskálás termoforézis
MyPhoNe	miozin foszfatáz N-terminális szekvenciaelem
MYPT1	miozin foszfatáz célirányító alegység 1
MYPT1 ²³⁻³⁸	MYPT1 peptid ²³ D- ³⁸ F aminosav
MYPT1 ⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹	MYPT1 peptid ⁶⁹⁰ R- ⁷⁰¹ L aminosav
MYPT2	miozin foszfatáz célirányító alegység 2
NHS	N-hidroxi-szukcinimid
NIPP-1	PP1 sejtmagi inhibitor fehérje
NMR	mágneses mag rezonancia spektroszkópia
NMR-STD	mágneses mag rezonancia spektroszkópia telítési átvitel differencia
NO ₂ -ADPYASG	(5-nitro-pirid-2-il) 2-acetamido-2-deoxi-3,4,6-tri-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
NO ₂ -BASG	4-nitrobenzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
NO ₂ -PYASG	(5-nitro-pirid-2-il) 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
OA	okadánsav
PASG	fenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
PBS	foszfát puffer
PEASG	2-feniletil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranóz
pedunculin	2,3; 4,6-di-(S)-hexahidroxidifenil-β-D-glükóz

PGG	1,2,3,4,6-penta-O-galloil- β -D-glükóz
PHAP-I	humán leukocita antigén receptor II asszociált fehérje I
PHI	foszfatáz holoenzim inhibitor
PIP	foszfatáz kölcsönható peptid
PKA	protein kináz A
PKB	protein kináz B
PKC	protein kináz C
P-MYPT1 ⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹	foszforilált MYPT1 peptid ⁶⁹⁰ R- ⁷⁰¹ L aminosavig
PP1	protein foszfatáz 1
PP1c	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
PP1c α	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység α izoforma
PP1c β (δ)	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység β (δ) izoforma
PP1c γ 1-2	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység γ 1 és 2 izoforma
PP2A	protein foszfatáz 2A
PP2Ac	protein foszfatáz 2A katalitikus alegység
PP2Bc	protein foszfatáz 2B katalitikus alegység
PP2C	protein foszfatáz 2C
PP4	protein foszfatáz 4
PP5	protein foszfatáz 5
PP6	protein foszfatáz 6
PP7	protein foszfatáz 7
PPM	Mg ²⁺ vagy Mn ²⁺ függő foszfatázok
PPP	foszfoprotein foszfatázok
PR/65A	Ser/Thr protein foszfatáz 2A 65 kDa szabályozó fehérje
praecoxin B	4,5-di-O-galloil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glükóz
P-Ser	foszfo-szerin
P-Thr	foszfo-treonin
PTP	foszfo-tirozin foszfatázok
RIPA puffer	Radioimmunoprecipitációs puffer
ROK	Rho-A által aktivált kináz
rPP1c	rekomináns protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
RU	rezonancia egység
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát-pliakrilamid gél elektroforézis
Ser	szerin

SET/I2PP2A	PP2A Inhibitor-2
SNAP-25	25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált fehérje
SPR	felületi plazmon rezonancia
STD	telítés-átvitel differencia
TBS	25 mM Tris/HCl pH 7,4; 27 mM KCl; 136 mM NaCl
TBST	TBS, 0,1 % Tween 20
tellimagrandin 1	2,3-di-O-galloil-4,6-O-(S)-hexahidroxidifenil-β-D-glükóz
TFM-BASG	2-(trifluorometil)-benzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeleno-β-D-glükopiranoz
TFM-BSG	2-(trifluorometil)-benzil 1-szeleno-β-D-glükopiranoz
Thr	treonin
TM	tautomicin
TM puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,1 %(V/V) 2-merkaptoetanol
TMC	tautomicetin
Tris	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
Tween 20	polioxietilén(20)-szorbitán-laurát
Tyr	tirozin

Bevezetés

Az eukarióta sejtek fehérjéinek legalább egyharmada foszforilálható és a foszforiláció befolyásolja azok szerkezetét és funkcióját. A foszfofehérjék 86,4 %-ban szerin (Ser), 11,2 %-ban treonin (Thr), 1,8 %-ban pedig tirozin (Tyr) oldalláncon foszforilálódnak (Olsen és mtsai., 2006). A foszfát beépítését protein kinázok, kihasítását pedig protein foszfatázok katalizálják. Először a kinázok foszforilációt szabályozó szerepének tisztázása kapott nagyobb figyelmet, azonban később kiderült, hogy a protein foszfatázoknak is fontos szerepük van a fehérjék foszforilációs szintjének kialakításában.

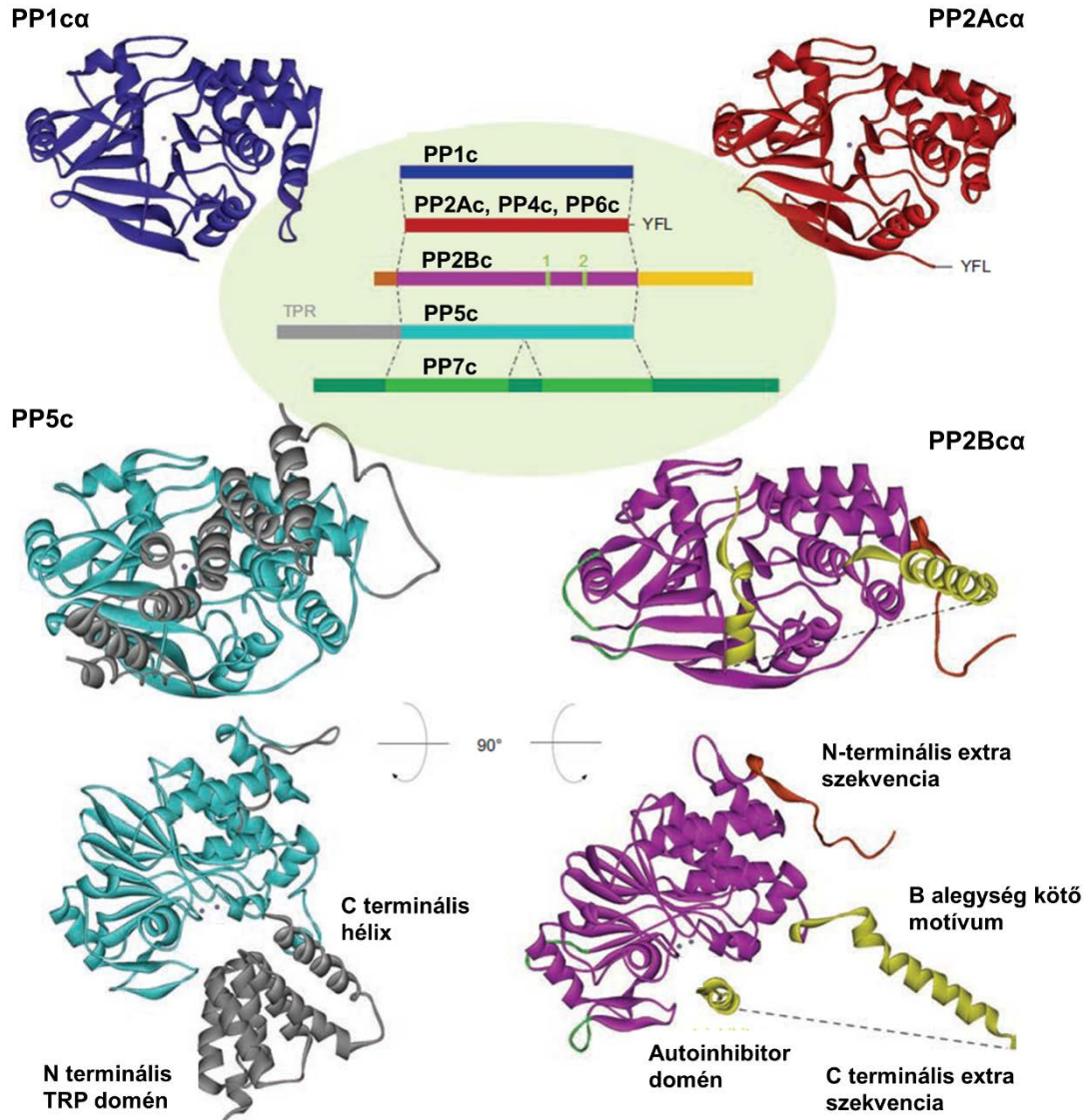
A foszfát csoportot kihasító foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázok (P-Ser/Thr) aktivitásának szabályozásában célirányító és lokalizáló fehérjék, gátló fehérjék és molekulák is részt vesznek (Zhang és mtsai., 2013). A protein kináz enzimek egy részének vizsgálatát elősegíti, hogy típusonként, néhány kivételtől eltekintve, kis számú fehérje foszforilációját katalizálják, így specifikus gátlószerek alkalmazása lehetővé teszi az általuk szabályozott fehérjék azonosítását és fiziológiai funkciójának vizsgálatát (Zhu és mtsai., 2005). A P-Ser/Thr vagy P-Tyr aminosavakra szelektív foszfatáz katalitikus alegységek ezzel szemben nagyszámú szubsztrát defoszforilációját képesek katalizálni a hozzájuk asszociált célra irányító fehérjéktől függően (Zhang és mtsai., 2013). Ennek tulajdonítható, hogy a gátlószerek alkalmazása nem mindig teszi közvetlenül lehetővé a pontos funkciók, illetve a célfehérjék felderítését és leírását.

Munkám során célul tűzttem ki tannin típusú vegyületek, peptidek és szelenoglikozidok protein foszfatáz -1 és -2A (PP1 és PP2A) enzimekre gyakorolt hatásainak vizsgálatát, azzal a céllal, hogy a már ismert foszfatázokat gátló/aktiváló molekulák mellett új effektor vegyületeket azonosítsunk.

Irodalmi bevezetés

Foszfoszerin/treonin (P-Ser/Thr) specifikus foszfatázok

A katalizált reakció mechanizmusa, valamint a résztvevő enzimek térszerkezete alapján a foszfatázokat három géncsaládba sorolják (Shi, 2009): aszpartát foszfatázok (FCP/SCP család), Mg^{2+} vagy Mn^{2+} -függő foszfatázok (PPM), valamint foszfoprotein foszfatázok (PPP). A következőkben a három családot elkülönítő sajátságokat tárgyaljuk.



1. **ábra A Ser/Thr specifikus foszfatáz katalitikus alegységek szerkezete.** A diagram felső, középső részén a protein foszfatáz katalitikus alegységek aminosav szekvenciájának sematikus ábrája látható. A szaggatott vonallal határolt színezett részek a konzervált szekvencia elemeket jelzik. A PP1c, PP2Ac, PP4c és a PP6c katalitikus alegységek ezekből a szekvencia elemekből épülnek fel. A PP2Bc tartalmaz extra szekvencia elemeket az N- és C- terminális régióban, valamint a katalitikus centrumnál, ezeket eltérő színekkel jelöljük a sematikus ábrán (a szaggatott vonalon kívül eső eltérő színű sávok). A PP5c szintén tartalmaz egy extra szekvenciát, a TRP domént, az N-terminális végen (szintén eltérő színnel jelöltük). A sematikus ábra mellett és alatt látható a katalitikus alegységek háromdimenziós szerkezete (PP1cα, PP2Ac, PP2Bc, PP5c), kiemelve a bennük található extra szekvencia elemeket (PP2Bc, PP5c), amit a sematikus ábrán feltüntetett színek segítségével jelöltünk. A képen látható PP2Bc kristályszerkezete nem teljes, a B alegységkötő domén és az autoinhibitor domén között elhelyezkedő kalmodulin kötő szerkezeti elem nincs ábrázolva. A PP2Bc autoinhibitor domén szerkezete, valamint a PP5c TRP szerkezete hasonló funkciót lát el: a katalitikus árokhoz kötődve blokkolják a szubsztát fehérjék kötődését és defoszforilációját. Az ábra nem tartalmazza PP7c fehérjét, mivel nem áll rendelkezésre megfelelő szerkezet (módosított ábra; Pereira és mtsai., 2011).

Az FCP/SCP családba tartozó enzimek szubsztát szelektivitását az enzim saját szerkezeti elemei szabályozzák, így ritkán képeznek több alegységes fehérje komplexeket.

A PPM családba tartozó fehérjék szintén kevésbé szorulnak szabályozó fehérjékre a szubsztráthoz történő irányításban. Aktív állapotban Mg^{2+} vagy Mn^{2+} fémiont tartalmaznak (Das és mtsai., 1996). Ismertebb képviselőik például a protein foszfatáz 2C (PP2C), piruvát dehidrogenáz foszfatáz és a PP2C-szerű foszfatázok (Barford és mtsai., 1998).

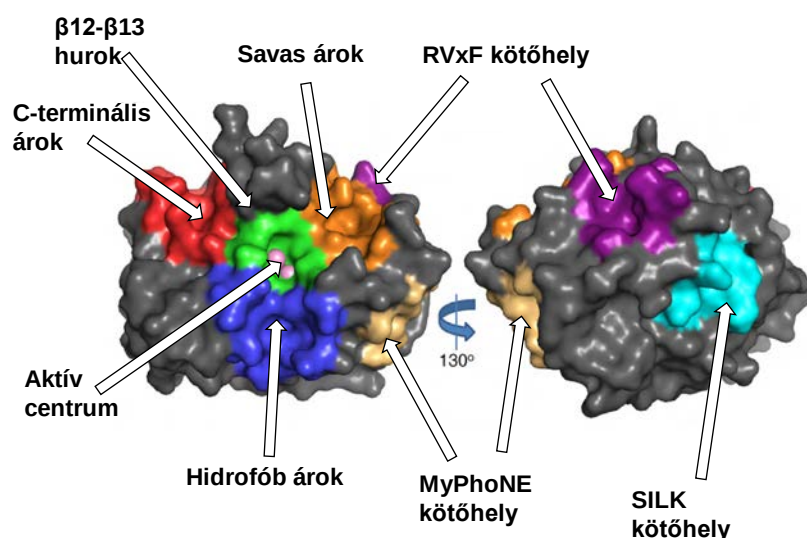
A PPP család tagjai az előbbiekkal szemben többféle módon szabályozva töltik be szerepüket a sejtek működésében. Ilyen a regulátor fehérjékkel történő kapcsolódás, a poszttranszlációs módosítások mind a regulátor fehérjék mind a katalitikus alegységek aminosav oldalláncain, valamint gátló fehérjék/molekulák kötődése a katalitikus alegységekhez (Chen és mtsai., 1992; Bryant és mtsai., 1999; Trockenbacher és mtsai., 2001). Az e családba tartozó protein foszfatáz- 1 (PP1),-2A (PP2A),-4 (PP4),-5 (PP5),-6 (PP6) enzimek katalitikus alegységei szerkezetükben, valamint az enzimek katalitikus mechanizmusában komoly hasonlóságokat mutatnak (1. ábra) (Barford és mtsai., 1998; Swingle és mtsai., 2004).

Foszfoprotein foszfatázok (PPP)

A családba 7 féle enzim (PP1-PP7), illetve ezen belül 13 katalitikus alegység izoforma tartozik (1. ábra) (Andreeva és mtsai., 2001). A katalitikus alegységek a katalitikus aktivitásért felelősek és általánosságban globuláris szerkezettel írhatók le. A katalitikus alegységek felépítésében részt vevő aminosavak sorrendje részben hasonló, viszont típustól függően tartalmaznak jellegzetes szekvencia elemeket is. A PP1c, PP2Ac, PP4c és PP6c csak egy konzervatív szekvenciából álló domént képeznek. A sejten belül holoenzimként látják el funkciójukat. A PP1c általában egy szabályozó fehérjével alakít ki funcionális komplexet, míg a PP2Ac, PP2Bc, PP4c és a PP6c két fehérje részvételével képez holoenzimet. Ezzel szemben a PP2Bc, PP5c és PP7c fehérjék tartalmazhatnak egyéb N/C-terminális szekvenciákat, amelyek auto-inhibitor funkciót vagy akár kalcium érzékenységet biztosíthatnak az enzim számára (1. ábra) (Pereira és mtsai., 2011).

PP1 és a PP2A enzimek

A PP1c enzimben két fémion található az Y alakú szubsztrátkötő árkok találkozási pontjánál, ami az enzim katalitikus centrumát képezi. (2. ábra) A hidrofób, savas és C-terminális árkok közvetlenül a katalitikus centrumba torkollanak, részt vesznek a szubsztrát molekulák koordinációjában és megkötésében (Egloff és mtsai., 1995; Bollen és mtsai., 2010). A PP1c szerkezetében megtalálható még egy úgynevezett $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok a fémionok közelében, és ez a szerkezeti motívum hasonló a PP1, PP2A, PP4 és a PP6 katalitikus alegységeknél, valamint szabályozza a katalitikus alegységek fehérjékkel és kisméretű molekulákkal való kölcsönhatását (Connor és mtsai., 1999).



2. ábra A PP1c szerkezete (módosított ábra; Bollen és mtsai, 2010).

A PP1 és PP2A enzimek a sejtekben foszforilált fehérjék több mint 90 %-ának defoszforilációjáért felelősek (Virshup és mtsai., 2009). A PP1 és PP2A aktivitások megkülönböztetése inhibitor fehérjékkel és molekulákkal történhet. Az Inhibitor-1 (I1) és -2 (I2) fehérjék csak a PP1 enzimre fejtenek ki gátló hatást. A természetben előforduló gátló hatású toxinok okadánsav (OA), tautomycin (TM), és fosztricin szintén eltérő mértékben gátolják a PP1 és PP2A enzimeket és ezzel segítik azok megkülönböztetését (Cohen és mtsai., 1990; Swingle és mtsai., 2007; Kelker és mtsai., 2009).

A PP1c szerkezete, fiziológiai szerepe és szabályozása

Az eukarióta genom 8 PP1c izoformát kódoló gént tartalmaz, ebből az emlősök 3 génnel rendelkeznek, 5 fehérjét kódolnak: amelyek a PP1 α_1 és α_2 , PP1 β/δ , PP1 γ_1 és a PP1 γ_2 (Honkanen és mtsai., 2002). Valamennyi izoforma szerkezete megfelel a PPP családnál korábban ismertetett leírásnak (ld. 2. ábra). A katalitikus centrumban Mn^{2+} és Fe^{2+} kationok találhatók. A PP1 enzimek, többek között, szerepet játszanak a glikogén anyagcsere, lipid metabolizmus, szinaptikus plaszticitás, sejt ciklus progresszió, simaizom kontrakció, inzulin jelátvitel és citoszkeleton átrendeződés folyamatainak szabályozásában (Chatterjee és mtsai., 2013).

A PP1c izoformák multimer holoenzimeket alakítanak ki a sejtekben. A megfelelő szabályozó alegységhez történő asszociációjuk biztosítja, hogy az enzim a felismerő szekvenciához kapcsolódva facilitált módon katalizálja a defoszforilációt (Liu és mtsai., 2014a). A PP1c felszíne túlságosan kicsi ahhoz, hogy valamennyi interakciós partnerével arra specifikus kötőhelyet alakítson ki, ezért a holoenzimet kialakító regulátor fehérjék kötő-

felszínei csaknem teljesen átfednek a PP1c felszínén és versengenek a kötődésért (Bollen, 2001). A legtöbb ilyen alegység tartalmaz egy kötő motívumot: [R/K][V/I]X[F/W] vagy röviden RVxF (R: arginin, V: valin, X: bármilyen aminosav, F: fenilalanin.). Az RVxF motívum és környezetének szerkezete meghatározza egy szabályozó fehérje affinitását a PP1c-hez, valamint elősegíti a másodlagos interakciós helyek kötődését, ami az aktivitás és a szubsztrát specificitás meghatározásához szükséges (Bollen, 2001; Wakula és mtsai., 2003). Az RVxF motívumot tartalmazó peptidek képesek gyengíteni a regulátor alegységek PP1c-vel kialakított interakcióját, mint pl. a miozin foszfatáz regulátor alegység (MYPT1) esetében (Tóth és mtsai., 2000).

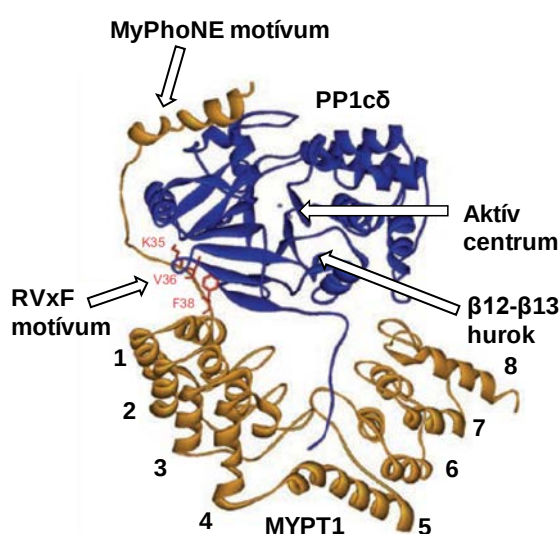
Az inhibitor fehérjék funkciója elsősorban a szabad celluláris PP1c aktivitásának gátlása (I1, I2, DARPP32, NIPP-1), továbbá szerepet tulajdonítanak nekik az egyes szabályozó alegységek cseréjében is (Ceulemans és mtsai., 2004). Más inhibitorok a holoenzimekhez kapcsolódva is képesek gátlást kifejteni (CPI-17, PHI, KEPI, GBPI) (Liu és mtsai., 2002; Liu és mtsai., 2004).

A szabályozás harmadik módja a regulátor alegységek reverzibilis módosítása a szintézist követően. Például a MYPT1 alegység a Thr696 és/vagy Thr853 oldalláncainak foszforilációja a komplexben található PP1cδ gátlását okozza (Lontay és mtsai., 2004; Wooldridge és mtsai., 2004; Murányi és mtsai., 2005)

A MYPT1 szerkezete és szerepe a MP kialakításában

A MYPT1 fehérje fontos szerepet játszott a vizsgált molekulák tanulmányozásában, ezért röviden ismertetjük a tulajdonságait. A MYPT1 fehérjét először a MP holoenzim részeként azonosították (Pato és mtsai., 1985; Alessi és mtsai., 1992). A kísérletek megerősítették a PP1c katalízisben játszott szerepét, míg a MYPT1-ről kimutatták, hogy a holoenzim szubsztráthoz történő célra irányítását és a sejten belüli lokalizációját vezérli. Az MP holoenzim harmadik tagja egy 20-21 kDa fehérje (M20/21), amelynek a foszfatáz aktivitásra gyakorolt hatása még nem ismert. Érdekes módon a MYPT1 a szövetek széles körében kifejeződik, míg az M20/21 a simaizom és a szívizom szövetekben, valamint trombocitákban (Murányi és mtsai., 1998) mutatható ki. Az M20/21 funkciójáról csak kevés ismeret áll rendelkezésre, az eddigi kísérletek azt bizonyították, hogy a Rho-A által aktivált kináz (ROK) aktivitását növelheti MYPT2 (szívizom specifikus MYPT) szubsztráttal szemben kardiomiocitákban, ami a MP gátlását idézi elő (Shichi és mtsai., 2010). Szintén megfigyelték az M20/21 szerepét a mikrotubulusok átépülésének dinamikájában (Takizawa és mtsai., 2003).

A három leginkább expresszáldó PP1c izoforma (α , β/δ , γ 1) közül a MYPT1 szinte kizárólag a PP1c β/δ -val alakít ki komplexet (3. ábra) (Scotto-Lavino és mtsai., 2010). A specificitást kialakító aminosav oldalláncok a PP1c δ központi régiójában helyezkednek el. A MYPT1 tartalmaz egy RVxF konszenzus szekvenciát (35KVKF38) ami esszenciális a PP1c δ -hoz való kötődés kialakításába (Tóth és mtsai., 2000). A kölcsönhatás kialakításában részt vevő olyan további kötőhelyeket is azonosítottak, mint az N-terminális szekvencia elemet (MyPhoNE), az ankirin szerkezet 1-es, 5-ös, 6-os, és 7-es ismétlődő motívumait (Terrak és mtsai., 2004), valamint a centrális régió 301-511 pozíciójában fellelhető aminosav oldalláncokat (Scotto-Lavino és mtsai., 2010).



3. ábra A MYPT1-PP1c δ komplex szerkezete. A számok az ankirin motívumokat jelölik sorrend szerint (módosított ábra; Pereira és mtsai., 2011).

A MYPT1 fehérje a Ser20 pozícióban történő reverzibilis foszforilációja révén képes szabályozni a MP komplex stabilitását és proteolízissel szemben mutatott érzékenységét is (Hu és mtsai., 2018). Habár nem azonosítottak a PP1c δ -ra specifikus kötőhelyet a MYPT1 C-terminális régiójában, de számos az aktivitás szabályozásában szerepet játszó foszforilációs helyet, mint a Thr696-ot és a Thr853-at (a humán izoformában) feltártak. Felhasználva a MYPT1 Thr696Ala és a Thr853Ala mutánsait kimutatták, hogy a MYPT1 foszforilálódása ezekben a pozíciókban gátló hatást fejt ki a PP1c-MYPT1 komplexre *in vitro* (Murányi és mtsai., 2005). A jelenlegi hipotézis szerint ezeknek az aminosavaknak a foszforilációja olyan átrendeződést idéz elő a MYPT1 szerkezetében, ami a foszfoinhibitor szekvencia és a PP1c térközelségbe kerülését és a peptidszakasznak a PP1c szubsztrátkötő zsebéhez történő kötődését eredményezi. Ezt a szerkezeti átrendeződést elősegítheti, hogy C-terminális domén

flexibilis és kevésbé rendezett. A szekvenciák a Thr696 és a Thr853 körül nagymértékben hasonlítanak az MLC20 P-Ser19 foszforilációs helyet körülvevő szekvenciákhoz (Terrak és mtsai., 2004). Ezt figyelembe véve a MYPT1-ben található szerkezeti elemek foszforilálódva olyan szubsztrát analógokként viselkedhetnek, amelyek a PP1c-hez a szubsztráthoz hasonló (vagy nagyobb) affinitással kötődnek, viszont a foszfátészter illeszkedése a katalitikus centrumban a defoszforiláció szempontjából kedvezőtlen. Ezért lassabban defoszforilálódnak mint a szubsztrát és ez az egyenlőtlen versengés nyilvánul meg a fiziológiai szubsztrát defoszforilációjának gátlásaként.

PP2Ac szerkezete, fiziológiai szerepe és szabályozása

A PP2Ac fehérjének az α és β izoformája ismert, ezek szekvenciája 97 %-os hasonlóságot mutat (Mayer és mtsai., 1991). A PP1c izoformáihoz viszonyítva csupán kb. 50 %-os egyezést találunk az aminosav sorrendben. A különbségek közül az egyik legjelentősebb a β 12- β 13 hurok szerkezete, az átfedő szakaszok az ismert globuláris szerkezet kialakításában vesznek részt (Xing és mtsai., 2006). Az aktív centrumban Mn^{2+} ionok mutathatók ki. A PP2A normál körülmények között a sejtek fehérjetartalmának közel 1 %-át teszi ki, ezért a lizátumok teljes foszfatáz aktivitásának jelentős részét biztosítja (Xi és mtsai., 2013). Számos sejtfolyamat szabályozásában részt vesz, így pl.: sejt proliferáció, sejthalál, sejt mobilitás, citoszkeleton átrendeződés, és a sejtciklus egyes lépéseit is kontrollálhatja (Janssens és mtsai., 2001). A PP2Ac deléciónja egérben és élesztőben letális. A génjeinek abnormális kifejeződése vagy mutációját általában tumorok képződéséhez vezet (Gotz és mtsai., 1998).

A PP2A szintén holoenzim komplexeket alakít ki a funkcióinak ellátására. A PP2Ac-hez egy úgynevezett állvány fehérje (PR/65A; α és β izoformák) kapcsolódik ez képezi az enzim alapszerkezetét (Du és mtsai., 2013). Az AC dimerhez B szabályozó fehérjék kapcsolódnak, amelyeknek a PP2A célra irányításában és lokalizációjában van alapvető szerepük.

A B alegység tehát szabályozza a szubsztrát preferenciát is, de foszfatáz aktivitást meghatározó tényezőként is szerepe lehet az enzim gátlása vagy aktiválása során. A B alegység négy családja ismert, amelyeknek számos izoformái lehetségesek (PR55/B, PR56/61/B', PR48/59/72/130/B'', PR93/110/B''') (Sontag, 2001).

Azonosítottak PP2A inhibitor fehérjéket: az I_1^{PP2A} (PHAP-I) és az I_2^{PP2A} (SET) funkciójukat tekintve hasonlóak a PP1-nél azonosított inhibitor fehérjékhez, de gátlási mechanizmusuk még nem teljesen tisztázott (Li és mtsai., 1996).

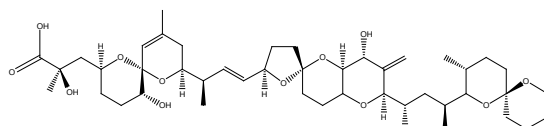
A PP2A szabályozásában szintén szerepet játszhat a komplexet alkotó fehérjék poszttranszlatív módosítása. A Thr, Tyr és a Ser oldalláncok foszforilációja például az aktivitást szabályozza, míg a katalitikus alegység metilációja a komplex összeszerelésében részt vevő különböző B, B', B'', B''' alegységek kötődését befolyásolhatja (Longin és mtsai., 2007).

A PP1 és a PP2A gátlása toxinokkal

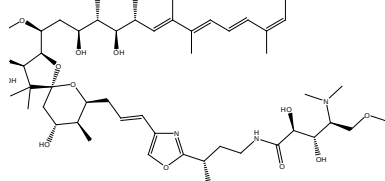
A PPP családba tartozó enzimek közül először a PP1 és a PP2A enzimeket azonosították a természetben előforduló toxinok célpontjaiként. Ezek a vegyületek az enzim szubsztrátkötő zsebéhez kötődve gátolják valamennyi szubsztrát defoszforilációját. A következőkben tárgyalt inhibitorok szerkezetét a 4. ábra mutatja be.

A toxinok első fontosabb csoportját a polióéterek képezik. A tengeri fekete szivacsból (*Halichondria*) izolált okadánsav (OA) volt az első azonosított szelektív, kisméretű PPP specifikus foszfatáz gátló toxin (Ozaki és mtsai., 1987). A PP1 ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$) és PP2A ($IC_{50} = 0,1 \text{ nM}$) enzimeket *in vitro* eltérő hatékonysággal gátolja (MacKintosh és mtsai., 1990). A kötődésében a katalitikus alegységek aktív centruma, a $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok és a hidrofób árok is részt vesz. Az ugyancsak polióéter kalikulín A (CLA) kötőhelye átfed ugyan a OA molekulával, de vele ellentétben az interakcióban fontosabb szerepe van az enzim savas árkanak, valamint katalitikus centrumának, és kevésbé szelektív inhibitorként viselkedik a PP1 és a PP2A tekintetében (Takeuchi és mtsai., 2009).

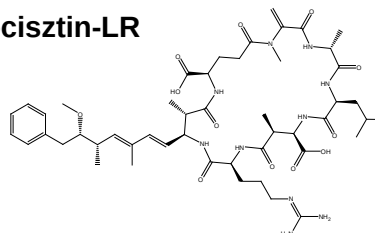
Okadánsav



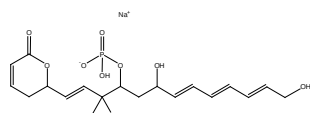
Kalikulín-A



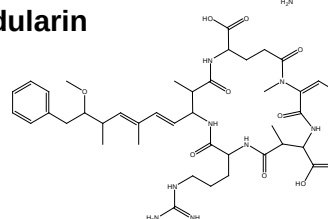
Mikrocisztin-LR



Fosztriécín



Nodularin



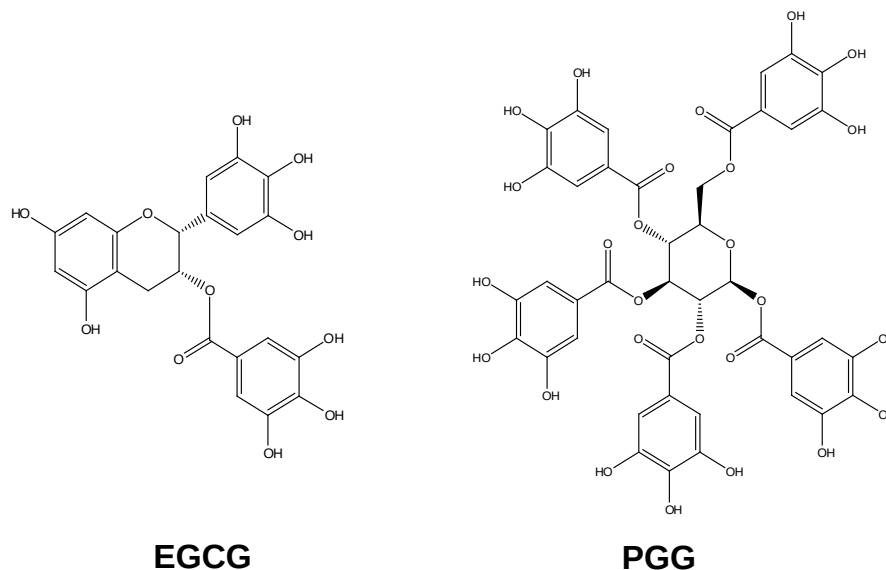
4. ábra Néhány ismertebb foszfatáz inhibitor toxin szerkezete.

A *Microcystis* kék-zöld algák ciklikus peptid toxinokat állítanak elő, mint pl. a mikrocisztin vagy a nodularin. Ezekre a vegyületekre májkárosító hatásuk hívta fel a figyelmet (Hooser és mtsai., 1989). A CLA-hoz hasonló módon működve fejtenek ki kevésbé szelektív intenzív gátló hatást a PP1 és PP2A enzimekre, valamint a többi PPP enzimre is. A mikrocisztin-LR (MCY-LR), a legismertebb mikrocisztin, ekvipotensen gátolja a PP1 és PP2A enzimeket ($IC_{50} = 0,2 \text{ nM}$) (Yoshizawa és mtsai., 1990). A vegyület egyik legfontosabb sajátága, hogy habár a kötődése önmagában is elegendő az enzimek gátlásához, képes mindkét enzimmel kovalens kötést kialakítani az interakció kialakulását követően, ezzel gyakorlatilag irreverzibilis gátlást okozva (Craig és mtsai., 1996). A PP1c esetében röntgenkristallográfiás eljárással a katalitikus centrum közvetlen közelében található 273Cys aminosavat azonosították, mint a kovalens kötés kialakításában részt vevő aminosav oldalláncot.

A poliketidek közül figyelmet érdemel a fostriecin, amit a *Streptomyces pulveraceus* talajlakó baktérium szintetizál. Szintén a PPP enzimek katalitikus árkához kötődve fejti ki gátló hatását, viszont a PP2A és PP4 enzimekkel egy cisztein oldalláncon (269Cys, PP2Ac) keresztül kovalens kötést képez a $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok közvetítésével, így ezekkel az enzimekkel szemben fokozott szelektivitást mutat (PP1, $IC_{50} = 4 \text{ }\mu\text{M}$; PP2A, $IC_{50} = 40 \text{ nM}$) (Roberge és mtsai., 1994; Takeuchi és mtsai., 2009). Szerkezetileg az MCY-LR-hez hasonlóan amfipatikus molekula, ezért szükséges a megfelelő membrántranszport rendszer a hatásuk kifejtéséhez (Swingle és mtsai., 2007).

A PP1 és PP2A gátlása tanninokkal.

A növényi metabolitok közül az egyik legnépesebb a tanninok csoportja. Kémiaileg ide sorolunk több antioxidás, gyulladásgátló, illetve tumor növekedés gátló anyagot (Rasouli és mtsai., 2016).



5. ábra Az EGCG és a PGG szerkezete.

Az antioxidáns hatású tanninok közül jelentősebbek a katechinek, ismertebb tagjai, pl. az epigallokatechin-gallát (EGCG) vagy a gallotanninok közzé sorolható penta-O-galloil-glükóz (PGG) (5. ábra) a mindennapokban fogyasztott közkedvelt főzetekben, népszerű italokban (pl. tea) megtalálhatóak (Wang és mtsai., 2011).

Az EGCG a zöld tea egyik fő komponense. Egyik legismertebb hatása, hogy a Ser/Thr specifikus kinázokra gátló hatást fejt ki (ERK 1/2, Akt/protein kináz B, p38 mitogén aktivált protein kináz és a ciklin dependens kináz 2) (Sah és mtsai., 2004). Másik jelentős szerepe, hogy a 67 kDa méretű lamin receptorhoz (67LR) kapcsolódva MP aktivációt vált ki melanóma sejtekben, mégpedig a PP2A egyik holoenzime aktiválásának közvetítésével (Tsukamoto és mtsai., 2014). Ezzel szemben ugyanakkor képes a PP1c ($IC_{50}= 1,4 \mu M$) és PP2Ac ($IC_{50}= 15 \mu M$), illetve a HeLa sejt lizátumok ($IC_{50}= 6,2 \mu M$) foszfatáz aktivitását gátolni (Kiss és mtsai., 2013). A gátlás mechanizmusát részben felszíni plazmon rezonancián (SPR) és NMR módszereken alapuló kötődési kísérletek tisztázták és molekuláris dokkolási módszerek is megerősítették. Az EGCG és az MCY-LR molekulák versengenek a rPP1c fehérjéhez való kötődésért, ami a kötőhelyek átfedésére utal. Ezek alapján, valamint dokkolási szimulációkra alapozva, az EGCG a PP1c szubsztrátkötő hidrofób árkához kötődik és a kölcsönhatást hidrogénkötések is stabilizálják (Kiss és mtsai., 2013).

A PGG a leggyakrabban fellelhető gallotannin növényekben (Zhang és mtsai., 2009). Az EGCG-hez hasonló módon képes gátló hatást kifejteni a foszfatázokra (PP1c, $IC_{50}= 0,4 \mu M$; PP2Ac, $IC_{50}= 6,6 \mu M$), illetve kötődni a rPP1c szubsztrátkötő hidrofób árkához SPR és NMR kísérletek alapján (Kiss és mtsai., 2013).

A PP1 aktiválása

A PP1 ismert aktivátorait javarészt a szabályozó fehérjékből származó peptidek képezik (Tappan és mtsai., 2008; Chatterjee és mtsai., 2012). Ezek a molekulák lehetnek deinhibitorok is, azaz a szabályozó és gátló fehérjék kötődését akadályozzák meg a PP1c-n. Például az izom G alegység (G_M) RVxF szekvenciát hordozó peptidje disszociálni képes a DARPP32-PP1c komplexet, és az így felszabaduló PP1c visszanyeri aktivitását (Westphal és mtsai., 1999).

Érdekes, hogy a mikrocisztinek kisebb, szintetizált szerkezeti egységeit (Adda, N-acetil-Arg-Adda) a PP1c direkt aktivátoraiként azonosították (Tappan és mtsai., 2008). Szintén érdemes megjegyezni, hogy a ceramidok némelyike képes direkt aktivációt kifejteni. A D-eritro- C_{18} -Ceramid aktiváló hatását kimutatták PP1 α és a PP1 γ izoformákon (Chalfant és mtsai., 1999).

A PP2A aktiválása

A PP2A aktivátorai többnyire erősen hidrofób szerkezettel és/vagy olyan funkciós csoportokkal jellemezhetők, amelyek hidrogén hidak kialakítására képes szerkezeti elemeket hordoznak. Az enzim felszíne több kötőhelyet is hordoz, amit az ilyen deinhibitor és direkt aktivátor molekulák tanulmányozása segíthet felderíteni (Leoni és mtsai., 1998). A ceramidok között mindkét aktivátor típusra találunk példát. A D-eritro- C_6 -ceramid a SET ($I2^{PP2A}$) fehérjéhez kötődve kiszorítja a fehérjét a PP2Ac-vel és a PR65-tel alkotott komplexéből, visszaállítva a PP2Ac katalitikus aktivitását (Mukhopadhyay és mtsai., 2009). Számos molekula ismert, amelyek ugyanezzel a mechanizmussal deinhibitoroként aktiválják a PP2A enzimet (FTY720, AAL(S)) a SET inhibitor C-terminálisához kötődve (Neviani és mtsai., 2007; Arnaud és mtsai., 2011). A direkt aktivátorok közé tartozó D-eritro- C_{18} -Ceramid a monomer és a heterotrimer enzim formákat aktiválja magasabb koncentrációnál, alacsonyabb koncentrációnál viszont gátló hatást fejt ki (Chalfant és mtsai., 1999). A D-eritro- C_6 -ceramid csak a monomer formát aktiválja (Chalfant és mtsai., 2004). A PP2A direkt aktivátorai a fenotiazinok és a perpenazin, amelyek több szubsztráttal szemben is fokozzák az enzim aktivitását (Sangodkar és mtsai., 2017). Az enzim aktiválásának egy alternatív módja a CIP2A inhibitor fehérje expressziójának gátlása, ami kimutatható sejtes rendszerekben a szintetikus kemoterapikum bortezomib vagy erlotinib hatására (Chen és mtsai., 2009; Chen és mtsai., 2013). A növényi eredetű celastrol viszont a CIP2A ubikvitinálódását és ezen keresztül a fehérje degradációját váltja ki, ezzel fokozva a PP2A aktivitását (Liu és mtsai., 2014b).

Célkitűzések

A PP1 és PP2A gátlása vagy aktiválása a Ser/Thr oldalláncon foszforilált fehérjék több, mint 90 %-ának foszforilációs szintjét érintheti, ezért számos sejtfolyamat lejátszódása reagálhat érzékenyen az enzimek aktivitás változására. A gyakorlatban elterjedt inhibitorok használata a foszfatáz funkciók feltárására azonban nem biztosít abszolút megoldást mivel csak kevésbé szelektívek és már alacsonyabb koncentráció mellett is citotoxikusak. Az irodalmi adatok alapján az is körvonalazódik, hogy az enzimek gátlása számos esetben elősegítheti a sejtek malignus transzformálását, valamint a rákos sejtek túlélését is, míg a foszfatázok aktiválása ellentétes hatással bír. A fentiek alapján nem csoda, hogy új, típus-specifikus gátlószerek és aktivátorok azonosítása, valamint ezek lehetséges farmakológiai alkalmazása a kutatások középpontjában állnak. A munkacsoportban folyó korábbi kutatások arra utaltak, hogy a polifenol típusú vegyületek a PP1 részlegesen szelektív gátlószerei, ezért érdekesnek tűnt megvizsgálni az ellagitanninok családjának foszfatáz aktivitásra, valamint ezeknek a természetben is előforduló vegyületeknek a sejtek életképességére gyakorolt hatását is. Korábbi kísérletekből szintén ismert, hogy a MYPT1 regulátor fehérje foszforilációja gátló hatású a PP1c aktivitásra, az azonban nem tisztázott, hogy vajon a gátló foszforilációs helyet tartalmazó peptid is befolyásolja-e a foszfatáz aktivitást. Felmerül az a kérdés is, hogy más glükóz származékok milyen módon befolyásolják a foszfatáz aktivitást és ezért tanulmányoztuk szelenoglikozidok hatását a PP1 és PP2A aktivitására. Ezek a vegyületek viszont aktiválták mindkét foszfatázt, ami egy előremutató felismerés volt.

Mindezek alapján kísérleteink az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

1. Az ellagitanninok hatásának tanulmányozása a PP1 és PP2A enzimek aktivitására: típus-szelektivitás meghatározása, kölcsönhatások kvantifikálása és sejtes rendszereken történő vizsgálatuk.

2. Foszforilált MYPT1 peptid és PP1c kölcsönhatásának tanulmányozása és a gátló hatás mechanizmusának feltárása.

3. Szelenoglikozidok foszfatázt aktiváló hatásának tanulmányozása: szerkezet-aktiváló hatás összefüggések meghatározása.

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

Anyagok és módszerek

Anyagok

A kísérletekhez a következő anyagokat és vegyszereket használtuk fel a megadott forrásokból: Hela sejtvonal (cervix karcinóma) (European Collection of Cell Cultures). MEM (Minimum essential medium), L-glutamin, Tripszin/EDTA, BSA (Bovine Serum Albumin), SIGMA FAST proteáz inhibitor koktél (EDTA free), FM 2-10 sztril festék, anti-SNAP-25 antitest (Sigma Aldrich, S9684); [³²P]ATP[γP] (Izotóp Intézet Kft.); Szenzor Chip CM5, N-etil-N'-dimetilaminopropil-karbodiimid (EDC), N-hidroxiszukcinimid (NHS), Amin Kapcsolási kit, GST kapcsolási kit (Biacore AB); anti-SNAP-25^{pThr138} antitest (Abgent, #AP15001a). MYPT1_human és MYPT1_human_P (MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹, és P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹) peptidek (Thermo Fisher Scientific). Minden egyéb vegyszert és anyagot az elérhető legnagyobb tisztaságban alkalmaztunk a munkánk során.

Vegyületek

A kísérletekhez használt tellimagrandin I (Feldman és mtsai., 1994), praecoxin B, mahatbin A (Khanbabaee és mtsai., 1998), pedunculagin (Feldman és mtsai., 1996), 1,2-di-O-galloil-4,6-(S)-hexahidroxil-difenil-β-D-glükóz (GHG) (Yagi és mtsai., 2009) ellagitanninokat, amelyeket a referenciákban megadott módon szintetizáltak/tisztítottak Dr. Kurtán Tibor és Dr. Karamali Kahanbabaee (Debreceni Egyetem, Kémia Intézet, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A tellimagrandin I vegyületet a későbbiekben a Nacali Tesque Inc. (Kyoto, Japán) cégtől vásároltuk. A szelenoglikozidokat Prof. Dr.Szilágyi László laboratóriumában szintetizálták és jellemezték (Kumar és mtsai., 2012). Az ellagitanninok (10 mM) és a szelenoglikozidok (50 mM) törzsoldatait a vegyületek dimetil-sulfoxid (DMSO) oldószerben történő feloldásával készítettük. A kísérletek során a vegyületeket különböző koncentrációkban alkalmaztuk a vizsgálati oldatokban és az eltérő hígításokkal az oldatba kerülő DMSO mennyiségeket a kontroll minták is tartalmazták.

Fehérjék

A kísérletekhez felhasznált fehérjéket korábban közölt eljárások alapján tisztítottuk: nyúl vázizom PP1c és PP2Ac (Kiss és mtsai., 2013), hexa-hisztidin konjugált PP1c delta izoforma (rPP1cδ) (Tóth és mtsai., 2000), FLAG peptid konjugált PP1c alfa izoforma (rPP1cα) (Hirschi és mtsai., 2010), GST-MYPT1 (Kiss és mtsai., 2008), ³²P-jelzett 20 kDa- molekulatömegű pulyka miozin könnyű lánc (³²P-MLC20) (Erdődi és mtsai., 1995), inhibitor 2 (I2) (Hirschi és mtsai., 2010). A FLAG-MYPT1-PP1cδ holoenzim komplexet az alábbiak szerint tisztítottuk:

tsA201 sejteket transzfektáltunk FLAG-MYPT1 plazmiddal (Bátori és mtsai., 2017), majd a fehérje túltermelését követően a sejtek lizátumából a FLAG-MYPT1-PP1c δ holoenzim komplexet Anti-Flag M2 affinitás gél segítségével (Sigma Aldrich) tisztítottuk a gyártó leírásának megfelelően.

Foszfataz aktivitás meghatározása *in vitro*

Vázizomból tisztított PP1c vagy PP2Ac (1,9-2,2 nM végkoncentráció), expresszált rPP1c α vagy rPP1c δ (2,71-3,72 nM végkoncentráció) enzimeket, valamint HeLa lizátumot TM pufferben (20 mM Tris/HCl; 0,1 %v/v merkaptotanol) ellagitanninok (0-100 μ M) vagy szelenoglikozidok (0-395 μ M) jelenlétében 30°C-on előinkubáltuk 10 percen keresztül. A reakciót 1 μ M végkoncentrációjú ^{32} P-MLC20 szubsztrát hozzáadásával indítottuk és 10 percen keresztül inkubáltuk (30 μ l). A reakciót 200 μ l 10 % TCA és 200 μ l 6 mg/ml BSA oldat hozzáadásával állítottuk le. A reakcióelegy centrifugálását (13000 rcf, 3 perc) követően 370 μ l felülúszó ^{32} P_i radioaktivitását határoztuk meg folyadékszintillációs Tri-Carb 2800TR készülékben (Erdődi és mtsai., 1995).

A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ gátló hatását a ^{32} P-MLC20 szubsztrát defoszforilációjára 1 : 100 enzim : szubsztrát koncentráció aránynál 100 nM vázizom (natív) PP1c, 10 μ M ^{32} P-MLC20 és 10, 100 vagy 500 μ M P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid jelenlétében határoztuk meg.

Az effektorok eltérő koncentrációinál meghatározott, százalékban kifejezett aktivitás átlagértékek pontjaira SigmaPlot szoftverrel görbét illesztettünk. A görbék függvény egyenleteit Microsoft Excel táblázatba rögzítettük és a Solver bővítményével meghatároztuk a gátlásokhoz és az aktiválásokhoz tartozó IC₅₀/EC₅₀ értékeket. Azoknál az aktiválási görbéknél, ahol a görbék telítési szakasza hiányzott az aktiváció maximumokat vettük figyelembe az EC₅₀ értékek becsléséhez.

Sejtenyésztés és sejtkelések: életképesség és foszfataz aktivitás meghatározása

A HeLa sejteket a forgalmazó által biztosított leírásnak megfelelően tenyésztettük. A kísérleteket mindig 80-90 % sejt konfluencia mellett indítottuk el szérum éheztetést követően, amit 17 órán keresztül 2 mM L-glutaminnal kiegészített MEM médiummal (MEM L-Gln oldat) végeztünk.

A sejtek életképességét Alamar esszében határoztuk meg. A kísérleteket 96 lyukú tenyésztő edényekben végeztük el. A vizsgált vegyületekből hígítási sort készítettünk MEM L-Gln oldatban (BSG, BASG, TFM-BSG, TFM-BASG: 0-393 μ M; Tellimagrandin I, mahtabin A, preaecoxin B, GHG, pedunculagin: 0-50 μ M). A széruméheztetéshez használt médiumot a

vegyületeket tartalmazó médiumra cseréltük, majd a tenyészeteket sejtenyésző inkubátorba helyeztük 24 órára (30 °C, 80% páratartalom). A kezelési közeget lecseréltük 20 µM resazurin tartalmú MEM L-Gln oldatra és a sejteket további 2 órát inkubáltuk az inkubátorban. Az életképes sejtek a resazurint rezorufinná redukálták, amit fluorimetriásan 560 nm-nél történő gerjesztést követően a 620 nm-en emittált fény alapján határoztunk meg. A negatív kontrollok fluoreszcencia jelét 100 %-nak tekintettük, és a kezelésekhöz tartozó fluoreszcencia adatokat ennek függvényében fejeztük ki százalékosan. A kapott értékek átlagát ábrázoltuk a szórás feltüntetésével.

A sejtek foszfatáz aktivitását különböző kezeléseket követően határoztuk meg. A sejteket 6 lyukú tenyésző edényekben a vegyületekkel (ellagitanninok, szelenoglikozidok) éheztetést követően 1 órán keresztül inkubáltuk. PBS-el történő mosást követően a mintákat TBS-EDTA pufferben (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 50 mM 2-merkaptoetanol; 0,15 % (m/v) proteáz inhibitor koktél) tártuk fel. Centrifugálás (17000 rcf, 10 perc) után a felülúszók fehérje tartalmát BCA módszerrel határoztuk meg és a minták foszfatáz aktivitását hígítás nélkül mértük ³²P-MLC20 szubsztráttal (további részleteket ld. az előző részben). Az effektorok nélkül mért aktivitásokat 100 %-nak tekintettük, és a kezelt mintákat a kontroll értékhez hasonlítottuk. Az így kapott relatív (%) meghatározott foszfatáz aktivitás értékek átlagát ábrázoltuk a szórás adatok feltüntetésével.

Felületi plazmon rezonancia (SPR)

A szelenoglikozidok és a tellimagrandin I rPP1cδ-val kialakuló kölcsönhatását felületi plazmonrezonancián alapuló kötődési módszerrel Biacore 3000 műszerrel vizsgáltuk. A szelenoglikozidok PP1c-vel való kölcsönhatását a rPP1cδ-GST-MYPT1 komplex képződésére gyakorolt hatásukon keresztül tanulmányoztuk. Anti-GST antitestet kovalensen kapcsoltunk CM5 szenzor felszínre, amin kapcsolási kit segítségével a gyártó ajánlása szerint. Az anti-GST-t tartalmazó felszínre GST- vagy GST-MYPT1 fehérjét immobilizáltunk SPR pufferben (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM ditiotritol; 2 mM MnCl₂; 0,05 % P20 detergens). Ezt követően 3 µM rPP1cδ fehérjét tartalmazó SPR puffert áramoltattunk a szenzor felszíneken 10 µl/perc áramlási sebességgel 7 percen keresztül TFM-BASG vagy Br-BASG jelenlétében (0-50 µM) vagy távollétében (asszociációs fázis). A felszíneket SPR pufferrel mostuk 5 percen keresztül (disszociációs fázis). A rezonanciajel (RU) változás az idő függvényében a szenzorhoz kötődő rPP1cδ mennyiségét jellemzi. A GST kontroll felszín a GST-MYPT1 felszínnel azonos módon lett kezelve a kísérlet során, így a GST-MYPT1 szenzor felszínen mértből kivonva a GST felszínen kapott rezonanciajelet a PP1c specifikus kötődését jellemző

adatokat kapjuk. A tellimagrandin I interakciójának vizsgálatánál a rPP1c δ -t amin kapcsolási kit segítségével CM5 szenzor felületéhez kapcsoltuk a korábban leírt eljárást alkalmazva (Kiss és mtsai., 2013). A szenzorchip felületén 35 μ l-t 50 mM NHS, majd 35 μ l 200 mM EDC oldatot áramoltattunk 5 μ l/perc átfolyási sebességgel 7 percen keresztül. Az aktiválást követően 5 μ M rPP1c δ -t immobilizációs pufferben (10 mM Na-acetát pH 5,5; 1 mM ditiotritol; 2 mM MnCl₂; 5 μ M okadánsav) vettük fel, majd 10 μ l/perc áramlási sebesség mellett 7 percen át áramoltattuk a felületeken keresztül. A fennmaradó kötőhelyeket 1 M (pH 8,0) etanolamin oldattal blokkoltuk (5 μ l/perc; 7 perc). Kontroll felszínként etanolamin blokkolt CM5 felszín használtunk. A tellimagrandin I-et SPR pufferben 0,5-2,5 μ M koncentrációban áramoltattuk a kontroll és az rPP1c δ kapcsolt felszínek felett. A kölcsönhatás asszociációs fázisát 7, míg a disszociációs fázisát 6 percen keresztül követtük. A felszíneket 10 mM glicin/HCl (pH 2,1) oldattal regeneráltuk. Az analit kötődését a felszínekhez rezonanciajelként (RU) regisztráltuk az idő (s) függvényében. A rPP1c δ felszíneken kapott rezonanciajelekből levonva a kontroll felszínen mért rezonanciajelet a PP1c-tellimagrandin I kölcsönhatást jellemző szenzogramokat nyertünk. A szenzogramokból a kölcsönhatást jellemző kinetikai, valamint asszociációs/disszociációs paramétereket a BiaEvaluation 3.1 szoftver (Biacore AB, Uppsala, Sweden) segítségével határoztuk meg 1 : 1 kölcsönhatási sztöchiometriát feltételezve. A kísérletek kivitelezésénél Dr. Bécsi Bálint segítségét vettük igénybe.

Izoterm titrációs kalorimetria (ITC)

A rPP1 α fehérjét ITC pufferben (25 mM Tris/HCl (pH 8,0); 100 mM NaCl és 1 mM DTT) dializáltuk 2 x 2 órán keresztül, majd 5-10 μ M koncentrációban a MicroCal ITC200 készülék mérőcellájába fecskendeztük. A referencia cellát ITC pufferrel töltöttük fel. Tellimagrandin I-et 60-100 μ M koncentrációban ITC pufferben automata fecskendővel adagoltunk a mérőcellába 18 lépésben 2 μ l térfogatokban 25 °C-on, 300 rpm fordulatszámú kevertetés és 5 μ cal/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 (MST Power: 20%, LED Power: 90 %) és a Monolith NT.LabelFree (MST Power: 60 %, LED Power: 80 %) műszerek (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Németország) segítségével végeztük. A jelölés nélküli méréseket a Monolith NT-LabelFree segítségével 250 nM rPP1 α jelenlétében kiviteleztük, míg a Monolith NT.115 műszer esetében NT-647 (NHS jelölő módszer, NanoTemper Technologies GmbH Munich, Németország) festékkel jelzett 170 nM rPP1 α

oldattal végeztük. A rPP1c-t és a kölcsönható ligandokat MST pufferben (25 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM TCEP; 0,1 % (m/V) PEG 8000) oldottuk. Tellimagrandin I, EGCG, PGG vagy a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid felhasználásával 16 felező hígítást készítettünk MST pufferben, majd jelölt (EGCG, P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid) vagy jelöletlen (tellimagrandin I, PGG) rPP1 α fehérje oldatával tovább hígítottuk a mintákat úgy, hogy a ligandumok koncentrációja 7,32 nM -120 μ M (polifenolok esetén), vagy 61 nM -1 mM (P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid esetén) tartományba essen. Az oldatokat Zero Background Premium Coated (NT.LabelFree) vagy Premium Coated üveg kapillárisokba (NT.115) töltöttük. A kötődések hatására bekövetkező belső (NT.LabelFree) vagy a fehérjéhez kapcsolt fluoreszcens 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 500 Mhz frekvencián 5 mm z-gardians multinukleáris proton detektáló próbával korábban publikált módszerrel (Kiss és mtsai., 2013). Tellimagrandin I-et (0,48 mg) 500 μ l D₂O foszfát pufferben (pH 6,5) oldottuk (1,2 mM) és az oldat ¹H-NMR és STD spektrumát 293 K hőmérsékleten meghatároztuk 10 μ M rPP1 α vagy rPP1 δ távollétében, illetve jelenlétében. Mindkét rPP1c izoforma esetében hasonló jeleket kaptunk. A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptiddel (1,3 mM) végzett NMR-STD kísérletek a fenti körülmények mellett történtek. Az NMR méréseket Dr. E. Kövér Katalin és Raics Mária végezte.

Dokkolási szimulációk

A PP1c-szenoglikozid dokkolási kísérletek során a rPP1c-nek egy RVxF motívumot tartalmazó peptiddel (Chatterjee és mtsai., 2012) alkotott komplexének röntgenkristallográfiás szerkezete szolgált alapul (Protein Data Bank ID: 4G9J). A kötődő peptid RVxF motívumának kötőfelzíne szolgált referenciaként a felületi dokkolási kísérletekhez, hogy a szenoglikozid kötődését a rPP1c-hez jellemezzük. Egy 25 x 25 x 25 Å kockában az Autodock Vina programot alkalmaztuk (Trott és mtsai., 2010) a dokkolás számításainak kivitelezéséhez (<http://vina.scripps.edu/>), és a legnagyobb affinitást mutató szerkezeteket vetettük alá további analízisnek. A kísérletek során feltárt hidrofób interakciós felületeket MGL Tools (<http://mgltools.scripps.edu> The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) segítségével vizsgáltuk (Morris és mtsai., 2009). A Bioclipse szoftver Ballon bővítményét felhasználva 3D modelleket hoztunk létre a szenoglikozidokból (Spjuth és mtsai., 2007; Vainio és mtsai., 2007). 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 (Pettersen és mtsai., 2004). A dokkolási szimulációkat Tamás István végezte el.

Szinaptoszóma preparálás és exocitózis vizsgálatok

A szinaptoszómákat C3H egér cerebrális kortexéből preparáltuk korábban közölt eljárás alapján (Horváth és mtsai., 2017). A kortexek szövetét homogenizáló pufferben (0,32 M szacharóz, 1 mM EDTA; 0,25 mM DTT, pH 7,4) vettük fel (1g szövet/10 ml homogenizáló puffer). Üveg potter segítségével a szövetet homogenizáltuk, majd 1000 g fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A felülúszót 12 ml-re egészítettük ki homogenizáló pufferrel és 2-2 ml- Percoll gradientsre (2 ml 23 %; 2 ml 15 %; 2 ml 10 %; 2 ml 3 % szacharóz tartalmú percol pH 7,4) felülrétegeztünk polikarbonát csövekben. Centrifugálás (32500 g, 5 perc, 4°C, L7-55 Beckman ultracentrifuga) után a 10/15 valamint a 15/23 %-os szacharóz frakciókat összegyűjtöttük és Krebs pufferben (118 mM NaCl; 5 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 1 mM MgCl₂; 10 mM D-glükóz; pH 7,4) négyszeresére hígítottuk. A preparátumot centrifugáltuk (12 600 g, 25 perc, 4 °C), majd az üledéket ismét Krebs pufferben vettük fel és megismételtük a centrifugálási lépést. Az üledéket (szinaptoszóma preparátum) ezt követően 3 ml Krebs pufferben vettük fel úgy, hogy 1,2 mM végkoncentrációban CaCl₂-t adtunk hozzá, majd tellimagrandin I, 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 a célfehérjéket Western blot analízissel vizsgáltuk.

Az exocitózis esszét egy már korábban közölt protokoll alapján kivitelezttük (Lontay és mtsai., 2012; Horváth és mtsai., 2017). Az alkalmazott FM 2-10 vízzoldékony sztril festék először a szinaptoszóma membránnal asszociál, majd a szinaptoszóma belsejébe endocitózissal bejut, és leadásra kerül a vezikula ismételt exocitózisa során, ha az újfent szinaptikus vezikulaként funkcionál. A szinaptoszómákat előinkubáltuk, majd az exocitózist 30 mM KCl hozzáadásával indukáltuk és az FM 2-10 festék kezelése hatására bekövetkező (negatív korreláció az exocitózis mértékével arányosan) fluoreszcencia jel változását (gerjesztési fény: 488 nm, emittált fény: 540 nm) Fluoroskan FL műszerrel mértük.

A Western blot analízishez feltárt minták fehérje tartalmát BCA fehérje mérési kit segítségével határoztuk meg, BSA fehérjével (0,125-1 mg/ml) készült kalibrációs görbe alapján. A szinaptoszóma preparátumokat 5xSDS minta pufferben (50% glicerin; 10% SDS; 0,31 M Tris/HCl pH 6,8; 100 mM ditiotritol; 0,01% brómfenol kék) forraltuk (100 °C, 5 perc),

majd 30-50 µg fehérjét vittünk fel 12 %-os SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) gélre és a fehérjék elválasztását 120 V feszültség mellett végeztük. A gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (100 V; 90 perc). A membránokat 5 %(m/v) BSA- tartalmazó TBST (Tris bufferd salin (TBS) plusz 0,1 %(v/v) Tween 20) pufferben blokkoltuk 2 órán keresztül 25 °C-on. Az antitesteket 0,5 %(m/V) BSA-tartalmazó TBST oldatban készítettük el a gyártó leírásának megfelelő hígításban. Az elsődleges antitestet 16 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk a membránokkal folyamatos billegtető kevertetés mellett, majd 3x10 perc TBST mosást követően a másodlagos torma peroxidáz enzim konjugált antitest oldatával 2 órát inkubáltuk a mintákat 25°C-on. Két TBST majd egy TBS mosást követően az antigén-antitest kölcsönhatásokat kemilumineszcenciás reagenssel detektáltuk Chemidock Touch műszerrel. A kapott jeleket denzitometráltuk és értékeltük Fiji (Image J) programmal. A szinaptoszoma preparátumokon végzett kísérletekben Dr. Horváth Dániel volt segítségemre.

Statisztikai analízis

A különböző csoportokban kapott normalizált adatokat ANOVA módszerrel elemeztük SigmaPlot szoftvert használva. Minden adathalmaz normál eloszlást mutatott. A többszörös összehasonlításoknál Holm-Sidak módszert alkalmaztunk. A diagramokon a mérési adatok átlagai szerepelnek a szórás feltüntetésével.

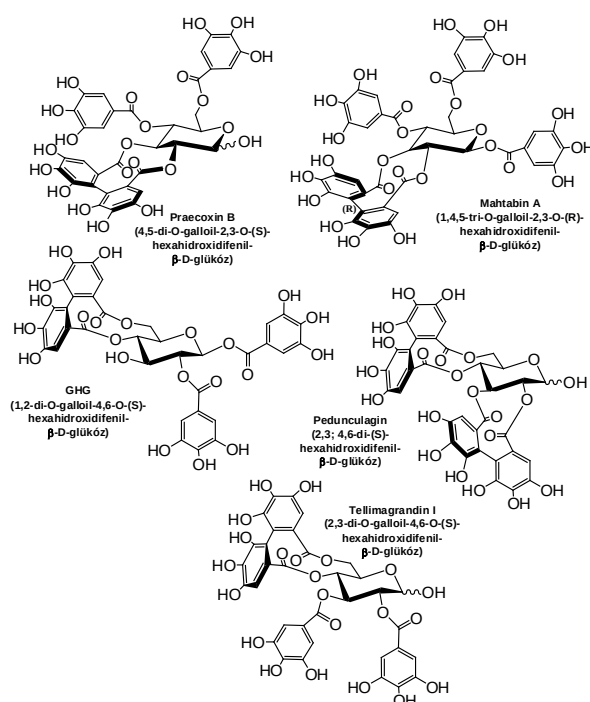
Eredmények

Az ellagitanninok hatásának tanulmányozása a PP1 és PP2A enzimek aktivitására: típus-szelektivitás meghatározása, kölcsönhatások kvantifikálása és sejtes rendszereken történő vizsgálatuk

Az ellagitanninok a korábban munkacsoportunk által tanulmányozott PGG és EGCG molekulákhoz hasonló szerkezetű vegyületek. Ma már a gyógyászatban is gyakran használt vegyületek, ezért biomolekuláris célpontjainak azonosítása fontos feladat. Tekintettel arra, hogy a PGG és az EGCG foszfatázgátló molekuláknak bizonyultak, tanulmányoztuk az ellagitanninok szerkezet-foszfatázgátló hatás összefüggéseit is.

Ellagitanninok hatásának vizsgálata PP1c és PP2Ac aktivitására

A 6. ábrán a vizsgált ellagitanninok szerkezetei láthatók. A kísérletekhez használt vegyületek a PGG-ből származtathatók, és ugyanazon funkciós csoportokból épülnek fel. A PGG-hez képest különbséget jelent az eltérő számú és pozíciójú hexahidroxidifenil csoport (kovalensen összekapcsolt fenil gyűrűk) jelenléte, a pedunculagin két ilyen csoportot is tartalmaz.

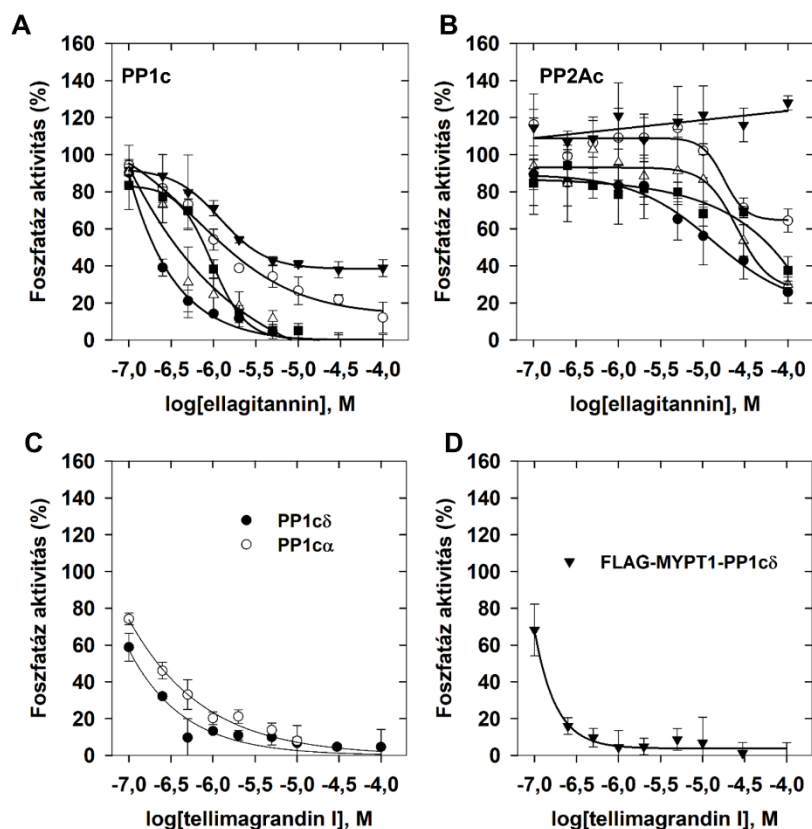


6. ábra A kutatások során vizsgált tanninok szerkezete.

Ezek a módosítások a PGG-hez képest merevebb szerkezeteket eredményezhetnek. Egy másik szerkezeti eltérés, hogy a központi glükopiranoz váz szabad (nem észterezett) hidroxil

csoportot is tartalmaz. A tellimagrandin I, a pedunculagin és a praecoxin B esetén ez a glikozidos hidroxil, míg a GHG esetén a gyűrű 3. pozíciójában található egy szabad hidroxil csoport.

A 7. ábra mutatja be az ellagitanninok koncentrációfüggő gátló hatását a PP1c és a PP2Ac aktivitására. A görbékkel meghatározható, a gátlást jellemző 50%-os gátlás eléréséhez szükséges koncentrációkat (IC_{50}) a 1. táblázat foglalja össze.



7. ábra Az ellagitanninok hatása a PP1c és a PP2Ac aktivitására. A foszfatáz enzimeket (PP1c (A); PP2Ac (B)) tellimagrandin I (●), mahtabin A (Δ), praecoxin B (■), GHG (○) vagy pedunculagin (▼) jelenlétében inkubáltuk 10 percen keresztül 30 °C-on, majd a reakciót 1 μ M ^{32} P-MLC20 hozzáadásával indítottuk és a foszfatáz aktivitást az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően határoztuk meg. A tellimagrandin I hatását megvizsgáltuk rekombináns rPP1 α és rPP1 δ enzimek aktivitására (C), valamint FLAG-MYPT1-PP1 δ holoenzim aktivitására (D). Az effektorok távollétében mért aktivitások átlagait tekintettük 100 %-nak, és a mérések átlagait ennek függvényében fejeztük ki a szórás értékek (SD) feltüntetése mellett. n= 3-5.

Az ellagitanninok koncentrációfüggő módon gátolják a PP1c (7.A ábra) és a PP2Ac (7.B ábra) aktivitását is, azonban a PP1c-re kifejtett gátló hatás sokkal hatékonyabb, mint a PP2Ac esetén (ld. 1. táblázat). Ezt jól tükrözik a gátlásokhoz tartozó IC_{50} értékek hányadosából a tellimagrandin I (1: 98), mahtabin A (1: 82) és a praecoxin B (1: 81) vegyületekre meghatározott szelektivitási arányok, amelyek csaknem százszoros eltérést mutatnak a két foszfatáz gátlási érzékenységeiben (1. táblázat).

Megvizsgáltuk a tellimagrandin I hatását rekombináns PP1 α és a PP1 δ izoformák aktivitására is és a natív (izomszövetből izolált) PP1c gátlásához hasonló IC₅₀ értékeket ($0,2 \pm 0,05 \mu\text{M}$ rPP1 α -ra és $0,1 \pm 0,02 \mu\text{M}$ rPP1 δ -ra) határoztunk meg (7.C ábra).

A polifenolok lehetséges fiziológiai hatását tekintve fontos kérdés, hogy gátló hatásuk hogyan érvényesülhet holoenzimre, amelyekben a katalitikus alegységekhez regulátor fehérjék is kapcsolódnak. Ezért megvizsgáltuk a tellimagrandin I hatását a FLAG-MYPT1-PP1 δ komplex (miozin foszfataz holoenzim) aktivitására, amelynek során a tisztított katalitikus alegységhez hasonló (IC₅₀ = $0,1 \pm 0,02 \mu\text{M}$) gátlási állandót kaptunk (7.D ábra). Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy a regulátor alegységek jelenléte valószínűleg nem befolyásolja a polifenolok katalitikus alegységeket gátló hatását.

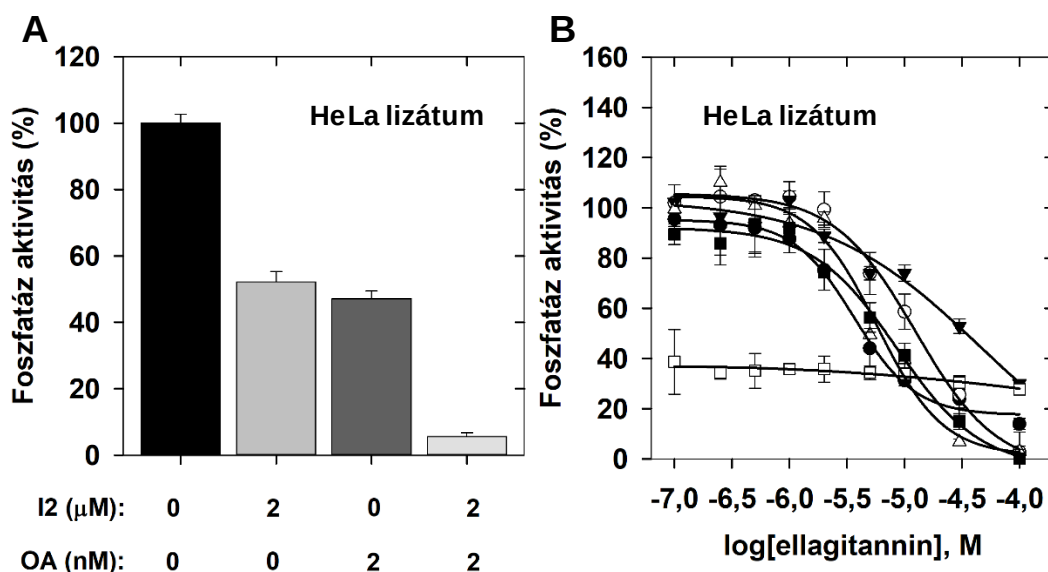
1. táblázat. Az ellagitanninok PP1c-re és PP2Ac-re kifejtett gátlásait jellemző IC₅₀ értékek. Az IC₅₀ értékeket az aktivitás mérések adatai alapján határoztuk meg és a táblázatban szórásokkal ellátott átlagokként tüntettünk fel.

Ellagitanninok	IC ₅₀ (μM)			PP1c/PP2Ac szelektivitás
	PP1c	PP2Ac	HeLa lizátum	
tellimagrandin I	$0,20 \pm 0,02$	$19,52 \pm 8,60$	$4,46 \pm 0,95$	1 : 97
mahtabin A	$0,41 \pm 0,18$	$33,77 \pm 8,44$	$6,19 \pm 0,37$	1 : 82
praecoxin B	$0,79 \pm 0,11$	$63,86 \pm 5,52$	$6,97 \pm 1,12$	1 : 80
GHG	$1,41 \pm 0,30$	> 100	$12,97 \pm 3,30$	n.d.
pedunculagin	$2,47 \pm 0,22$	> 100	$33,90 \pm 4,54$	n.d.

n.d.: nem meghatározott érték.

A PP1 és a PP2A enzimek aktivitását sejtlizátumban elkülöníthetjük mivel az inhibitor-2 fehérje ($2 \mu\text{M}$) jelenlétében (ami a PP1-et specifikusan gátolja) csak a PP2A aktivitása mérhető, míg OA jelenlétében (2 nM , amely csak a PP2A-t gátolja) a PP1 aktivitása határozható meg. A lizátum PP1 (48 %) és a PP2A (51 %) aktivitása közel azonos mértékű a mérések alapján (8.A ábra). A kezeléseket követő aktivitás mérések eredményei a sejtlizátumból azt mutatták, hogy az ellagitanninok inhibitor hatékonyságának sorrendje megegyezett a tisztított fehérjéken végzett kísérletekből származó sorrenddel (8.B ábra). Érdemes megjegyezni azonban, hogy az

IC₅₀ értékek ebben az esetben egy nagyságrenddel magasabbak, mint a tisztított enzimek esetén. (1. táblázat). Mindez arra utalhat, hogy a lizátumban mérhető aktivitásáért felelős foszfatáz holoenzimek eltérő érzékenységet mutatnak a vegyületekkel szemben. Ez ellen szól viszont, hogy a tisztított miozin foszfatáz (MP) holoenzimen (FLAG-MYPT1-PP1cδ) végzett aktivitás méréseknél a tellimagrandin I hasonló mértékben csökkentette az aktivitást, mint a rPP1cδ preparátum esetében (7.D ábra). Ez arra utal, hogy a csökkent érzékenységet nem a regulátor alegység-katalitikus alegység interakció okozhatja.

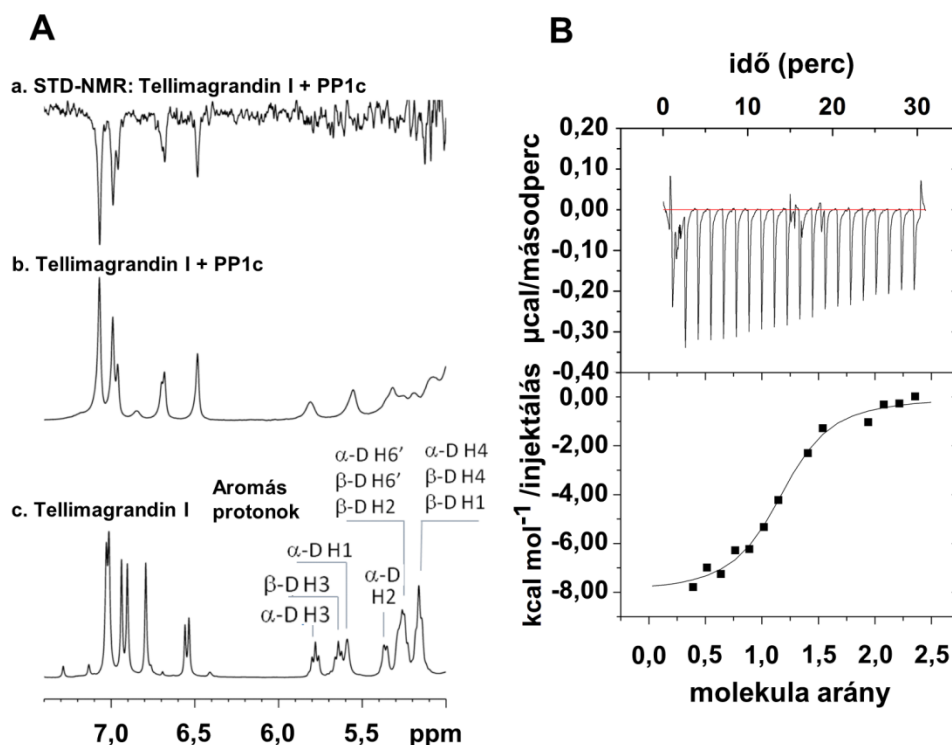


8. ábra Az ellagitanninok hatása a HeLa sejtizátumok foszfatáz aktivitására. OA illetve I2 jelenlétében meghatároztuk a PP1 (2 μM I2) és a PP2A (2 nM OA) aktivitások mértékét HeLa sejt lizátumokban (A). HeLa sejt lizátumot előinkubáltunk tellimagrandin I (●), mahtabin A (Δ), praecoxin B (■), GHG (○), pedunculagin (▼) vagy tellimagrandin I és 2 μM I2 (□; PP2A aktivitás) jelenlétében (B) 10 percen keresztül 30 °C-on, majd 1 μM ³²P-MLC20 jelenlétében további 10 percen keresztül folytattuk az inkubálást és megmértük a felszabadult ³²Pi aktivitását az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. A kontroll minták átlagait vettük 100 %-nak és a szórás adatokat feltüntetve ábrázoltuk az aktivitás százalékos értékeit a kocentráció függvényében. n= 3.

Mindezek mellett, ha a tellimagrandin I hatását a HeLa lizátum foszfatáz aktivitására I2 jelenlétében (csak PP2A aktivitás mérhető) tanulmányoztuk, azt tapasztaltuk, hogy a magasabb koncentrációk is csak minimális gátló hatást eredményeztek (8.B ábra), jó egyezéssel azon eredményeinkkel, hogy az ellagitanninok a PP2A aktivitását kevésbé befolyásolják. Mindezek tükrében azt feltételezzük, hogy az ellagitanninok szerkezetéből adódó sajátságok e molekulák számos fehérjével való kölcsönhatását teszik lehetővé, ami a sejtizátumok vizsgálata esetén hozzájárulhat az effektív koncentrációjuk drasztikus csökkenéséhez. Erre utal az is, hogy a tisztított foszfatázokkal történő vizsgálatok során sem alkalmazható a foszfatázok stabilitását biztosító inert fehérje (pl. BSA) mivel az jelentősen megnöveli az IC₅₀ értékeket polifenolok esetén (Kiss és mtsai., 2013), szintén az effektív koncentrációk csökkentésével.

Polifenolok interakciója PP1c-vel

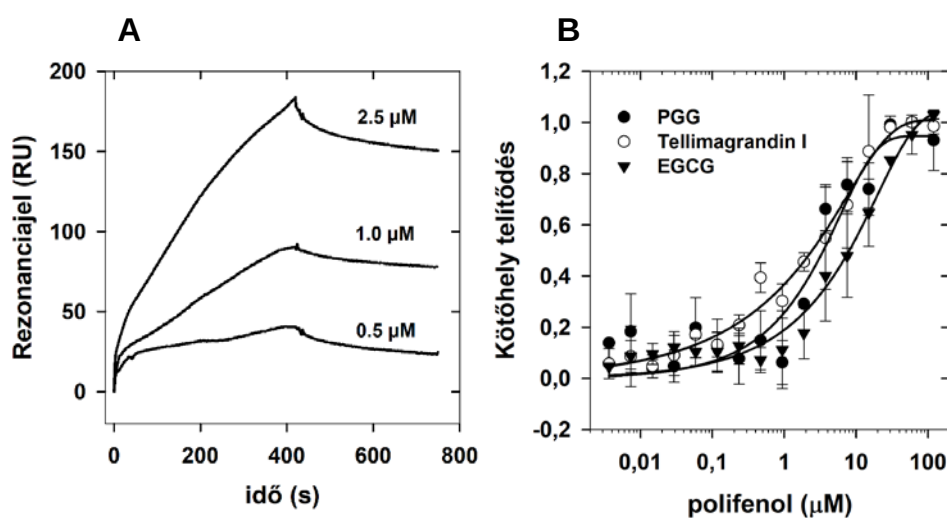
Az enzimkinetikai adatok mellett a polifenol-foszfataáz kölcsönhatások kvantitatív meghatározásával a kötődés molekuláris hátterére kívántunk adatokat nyerni különböző vizsgáló módszerek alkalmazásával (9. ábra és 10. ábra).



9. ábra A tellimagrandin I PP1 α -val való interakciójának vizsgálata NMR és ITC módszerekkel.
A: A tellimagrandin I és a rPP1 α kölcsönhatásának vizsgálata ¹H-NMR spektroszkópiával: **a:** tellimagrandin I telítés átviteli differencia (STD) ¹H-NMR spektruma rPP1 α jelenlétében. **b:** A tellimagrandin I ¹H-NMR spektruma rPP1 α jelenlétében. **c:** A tellimagrandin I ¹H-NMR spektruma. **B:** A tellimagrandin I és a rPP1 α kölcsönhatásának vizsgálata izoterm titrációs kalorimetriával (ITC). rPP1 α -t (10 μ M) titrálunk tellimagrandin I-el folyamatos kevertetés mellett 23 °C-on az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint és a folyamatot kísérő hőváltozást detektáltuk az idő függvényében. Meghatároztuk a kölcsönhatás termodinamikai paramétereit és a kölcsönhatás sztöchiometriáját ($\Delta H = 8,038 \pm 0,275$ kcal/mol; $S = 0,0036$ kcal/mol/K; $N = 1,16 \pm 0,03$).

Először NMR telítési differencia méréseket végeztünk a tellimagrandin I ¹H-NMR spektrumának felvételével 10 μ M rPP1 α jelenlétében (9.A ábra, b) vagy távollétében (9.A ábra, c), amelyből a telítési differencia spektrum (saturation transfer difference, STD) származtatható (9.A ábra, a). Az rPP1 α jelenlétében a tellimagrandin I aromás ¹H rezonancia jelei jelentősen kiszélesedtek, ami a szabad tellimagrandin I és a PP1c által kötött tellimagrandin I között kémiai kicserélődésre utal és feltételezi a hidrofób aromás gyűrűk részvételét a kölcsönhatásban. Korábbi eredmények szerint a PGG-rPP1c interakció vizsgálata a fentihez hasonló eredményeket adott. Tekintettel a tellimagrandin I és a PGG nagyfokú

szerkezeti hasonlóságára, feltételezhető, hogy a tellimagrandin I PP1c-t gátló hatása a PGG-hez hasonlóan az enzim hidrofób szubsztrát kötő árkával történő kölcsönhatásának tulajdonítható a PP1c felszínén. A tellimagrandin I-rPP1c kölcsönhatás hátterét izoterm titrációs kalorimetriával (ITC, 9.B ábra) vizsgáltuk. és meghatároztuk a kölcsönhatás disszociációs állandóját ($K_D = 0,23 \mu\text{M}$) és termodinamikai paramétereit ($\Delta H = 8,038 \pm 0,275 \text{ kcal/mol}$; $\Delta S = 0,0036 \text{ kcal/mol/K}$). A kölcsönhatás további elemzésére felületi plazmon rezonancián (SPR) és mikroskálás termoforézisen (MST) alapuló kötődési módszereket is felhasználtunk (10. ábra).

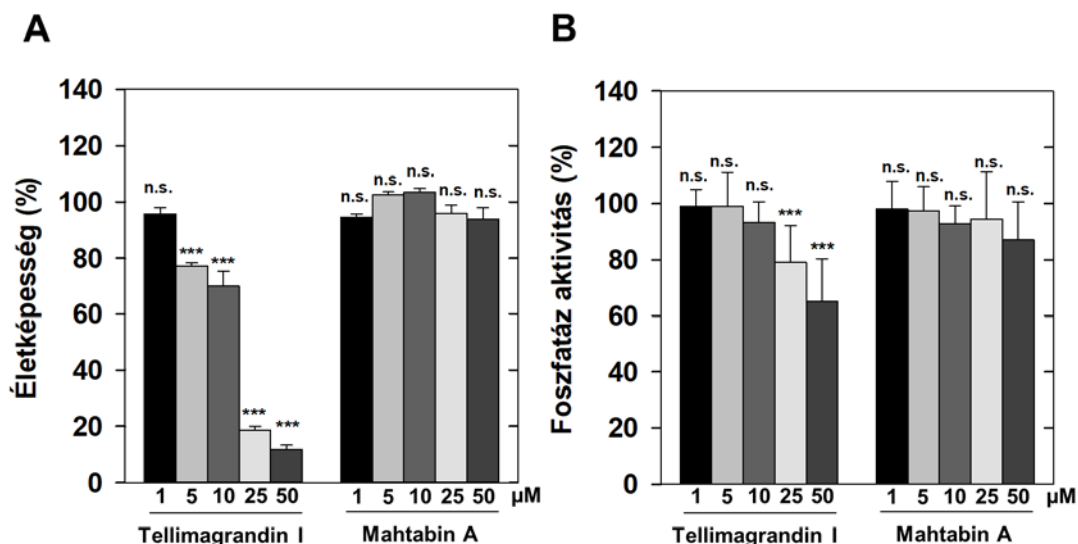


10. ábra A PP1c δ -tellimagrandin I kölcsönhatás vizsgálata SPR-módszerrel és a polifenolok PP1c α -val való interakciójának összehasonlítása MST módszerrel. **A:** A tellimagrandin I-rPP1c δ kölcsönhatásának vizsgálata felületi plazmon rezonanciával (SPR). CM5 szenzor chip felületére rPP1c δ fehérjét immobilizáltunk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint, majd tellimagrandin I-et (0,5 – 2,5 μM) áramoltattuk keresztül a felszín felett, és a rezonanciajel változását detektáltuk az idő függvényében. **B:** A polifenolok rPP1c α -val kialakított kölcsönhatásának vizsgálata mikroskálás termoforézis (MST) módszerrel. PGG, EGCG és tellimagrandin I hígításait készítettük el rPP1c α jelenlétében MST pufferben az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. A minták termoforézisét kísérő fluoreszcencia intenzitás változásokat rögzítettük a koncentráció függvényében.

A rPP1c-tellimagrandin I kölcsönhatásra kapott disszociációs állandó az SPR módszerrel (10.A ábra; $K_D = 0,31 \mu\text{M}$) hasonló volt az ITC-vel kapott értékhez ($K_D = 0,23 \mu\text{M}$), míg MST alkalmazásával ezeknél magasabb értéket ($K_D = 1,78 \pm 0,59 \mu\text{M}$) határoztunk meg (10.B ábra). A tellimagrandin I ($K_D = 1,78 \pm 0,59 \mu\text{M}$), PGG ($K_D = 3,08 \pm 0,35 \mu\text{M}$) és EGCG ($K_D = 8,2 \pm 4,3 \mu\text{M}$) PP1c-vel való kölcsönhatását MST módszerrel összehasonlítva a kölcsönhatás erősségének viszonyai a molekulák gátló hatásának különbségeit tükrözték.

Az ellagitanninok hatása sejtes rendszerekre

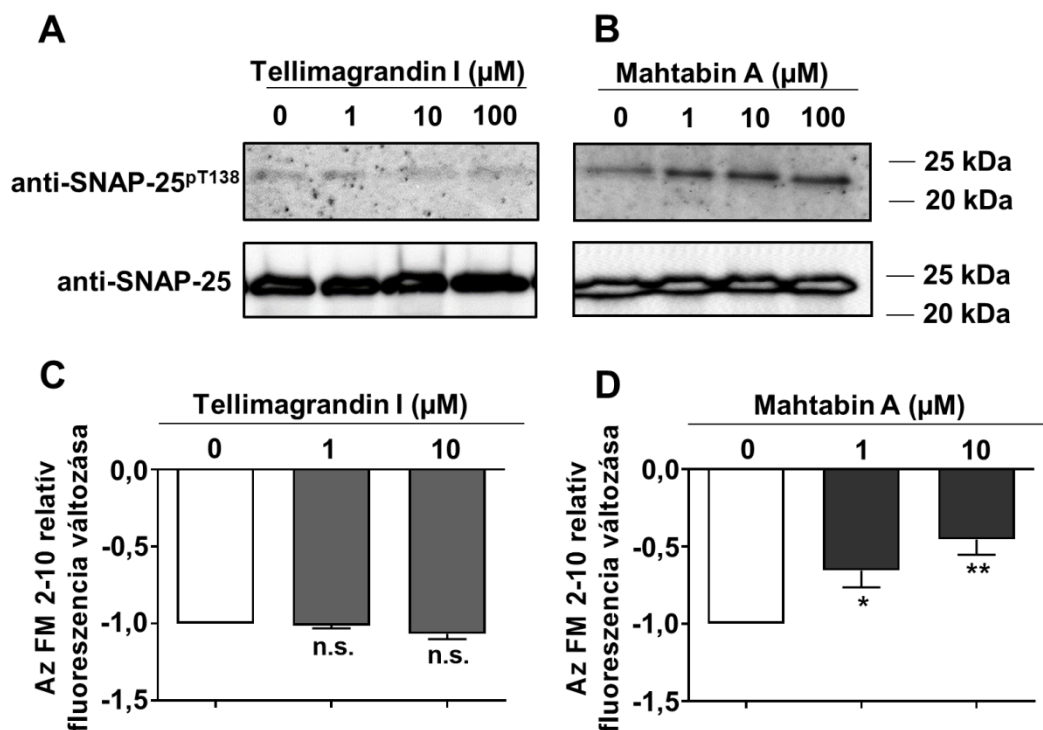
Korábbi tanulmányok felhívták arra a figyelmet, hogy a tellimagrandin I hatást gyakorol az emberi K562 leukémia sejtek differenciációjára (Yi és mtsai., 2004) valamint a HeLa sejtek között képződő sejt-sejt kapcsolatokra (Yi és mtsai., 2006).



11. ábra Ellagitannin kezelések hatása a HeLa sejtek életképességére és foszfátáz aktivitására. A HeLa sejteket az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően kezeltük tellimagrandin I-el és mahtabin A-val (0-50 μM), majd meghatároztuk a sejtek életképességét (A) és a foszfátáz aktivitását (B). Az ellagitanninok jelenléte nélkül mért életképességek és enzimaktivitások átlagait tekintettük 100 %-nak és a szórás (SD) feltüntetése mellett ábrázoltuk az adatokat a koncentráció függvényében. $n = 3$. Statisztikai analízis: ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s: nem szignifikáns.

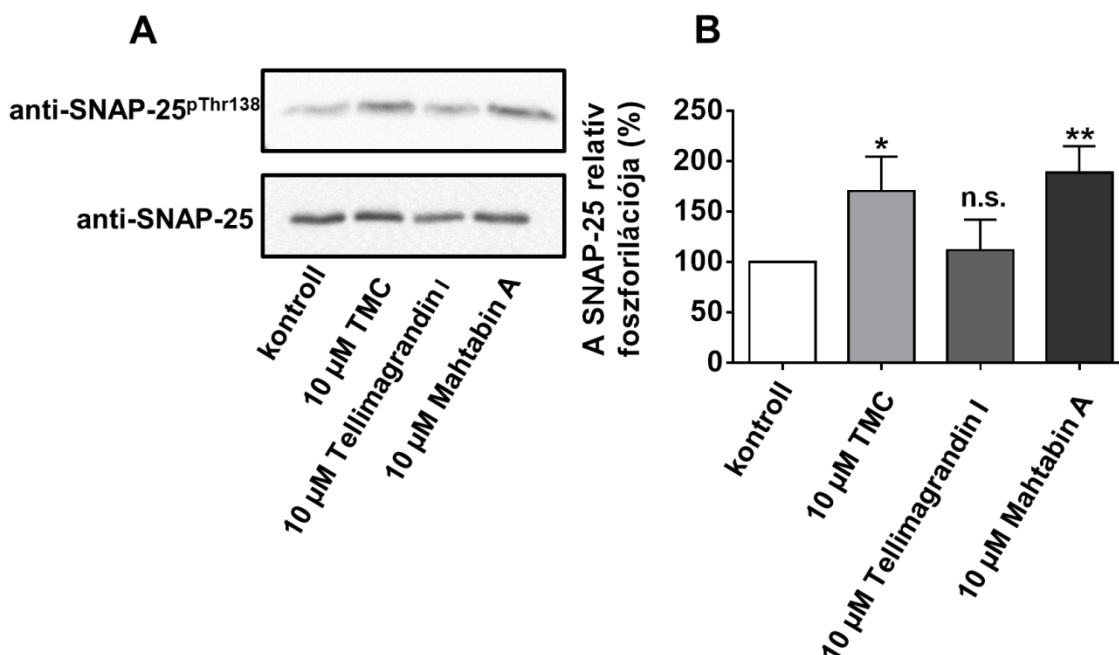
Ezért tanulmányoztuk a tellimagrandin I és a mahtabin A vegyületek hatását a HeLa sejtek foszfátáz aktivitására és életképességére. Az életképesség vizsgálatokat 24 órás kezeléseket követően végeztük. A tellimagrandin I 5-50 μM koncentráció tartományban a sejtek életképességét nagymértékben csökkentette (11.A ábra). A HeLa sejtek 1 órás kezelését követően a tellimagrandin I a foszfátáz aktivitását 10-50 μM koncentrációban szignifikáns mértékben csökkentette. A kapott adatok alapján arra következtetünk, hogy a tellimagrandin I által kiváltott foszfátáz gátlás hozzájárulhat az életképesség csökkenéséhez, viszont az eltérő kezelési idők, illetve a hatások molekuláris hátterének behatóbb ismerete nélkül e két jelenség összekapcsolása még nem egyértelműen bizonyított. A tellimagrandin I-hez szerkezetileg hasonló mahtabin A, ami a második legpotensebb inhibitornak adódott az aktivitás méréseknél (1. táblázat) azonban meglepő módon a HeLa sejtek kezelését követően nem okozott számottevő változást sem az életképességben sem a foszfátáz aktivitásban (11.A és B ábra). Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy a szerkezeti hasonlóság ellenére eltérhet a vegyületek membrán permeabilitása és ez lehet az oka a különböző intracelluláris hatásuknak.

A két *in vitro* foszfatázgátló molekulát (tellimagrandin I és mahtabin A) *ex vivo* preparátumon, nevezetesen egér agyból izolált, membránszerkezettel határolt szinaptoszóma preparátumon is teszteltük, ami meglehetősen meglepő eredményekkel szolgált (12. ábra).



12. ábra A tellimagrandin I és a mahtabin A hatása a szinaptoszómák SNAP-25^{Thr138} foszforilációjára és az exocitózisra. Tellimagrandin I (A; C) vagy mahtabin A (B; D) kezeléseket követően megvizsgáltuk a szinaptoszómák SNAP-25^{Thr138} foszforilációjának (A; B) illetve a KCl-dal kiváltható exocitózis mértékének (C; D) változását. A; B: Reprezentatív blotok anti-SNAP és anti-SNAP-25^{pThr138} specifikus antitestekkel történő jelölések eredményeként. C; D: Szinaptoszóma exocitózis változása a vegyületek jelenlétében FM 2-10 fluoreszcencia változás meghatározásával az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. Az ábrán a mérések átlagait ábrázoltuk a szórás (SD) feltüntetésével. Statisztika: ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s: nem szignifikáns. $n = 3$.

Korábbi tanulmányokból (Horváth és mtsai., 2017) tudjuk, hogy a 25 kDa tömegű szinaptoszóma asszociált fehérje (SNAP-25) foszforilációja a Thr138 oldalláncon a RhoA asszociált kináz és a MP szabályozása alatt áll, és foszforiláció mértéke fordított arányosságot mutat az exocitózis mértékével. Szinaptoszómákat tellimagrandin I vagy a mahtabin A jelenlétében inkubálva a SNAP-25^{Thr138} foszforilációjának változását követtük nyomon (13.A és B ábrák). A tellimagrandin I nem okozott változást a SNAP-25^{pThr138} szintjében, míg a mahtabin A 45 perc kezelést követően koncentrációfüggő módon (1-100 μM) növelte a SNAP-25^{pThr138} mennyiségét. Ezzel összhangban a KCl-al kiváltott exocitózis mértéke tellimagrandin I jelenlétében nem változott, mahtabin A viszont csökkentette az exocitózis mértékét.



13. ábra **A tellimagrandin I, mahtabin A, és TMC kezelések hatásainak összehasonlítása a szinaptoszómák SNAP-25^{pThr138} foszforilációjára.** **A:** Reprezentatív blotok anti-SNAP-25^{pThr138} és az anti-SNAP-25 antitestekkel foszfatáz effektorok jelenlétében és távollétében (kontroll). **B:** Denzitometriás analízis: a SNAP-25^{pThr138} intenzitásokat a SNAP-25 denzitás értékekre normalizálva a vegyületek jelenlétében és azok távollétében (100 %). Az ábrán a mérések átlaga $\pm$ SD van feltüntetve. ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s: nem szignifikáns.

Végül a tellimagrandin I és a mahtabin A kezeléseket összehasonlítottuk a TMC inhibitor hatásával, amit már korábban alkalmaztak szinaptoszómákon jól működő foszfatáz inhibitorként (Lontay és mtsai., 2012). Az 13. ábrán látható, hogy a TMC és a mahtabin A növelte a SNAP-25^{pThr138} szintjét a kezeletlen mintához képest, míg a tellimagrandin I hatástalan volt. E kísérletekkel megerősítettnek véltük, hogy a mahtabin A foszfatázt gátló hatásával szabályozza a szinaptoszómák excitózist. Megválaszolatlan marad azonban az a kérdés, hogy miért hat eltérően a szerkezetileg hasonló tellimagrandin I és a mahtabin A, és ráadásul ellentétesen a HeLa sejtek és a szinaptoszóma preparátum foszfatáz aktivitására, az előbbi életképességére és az utóbbi excitózisa.

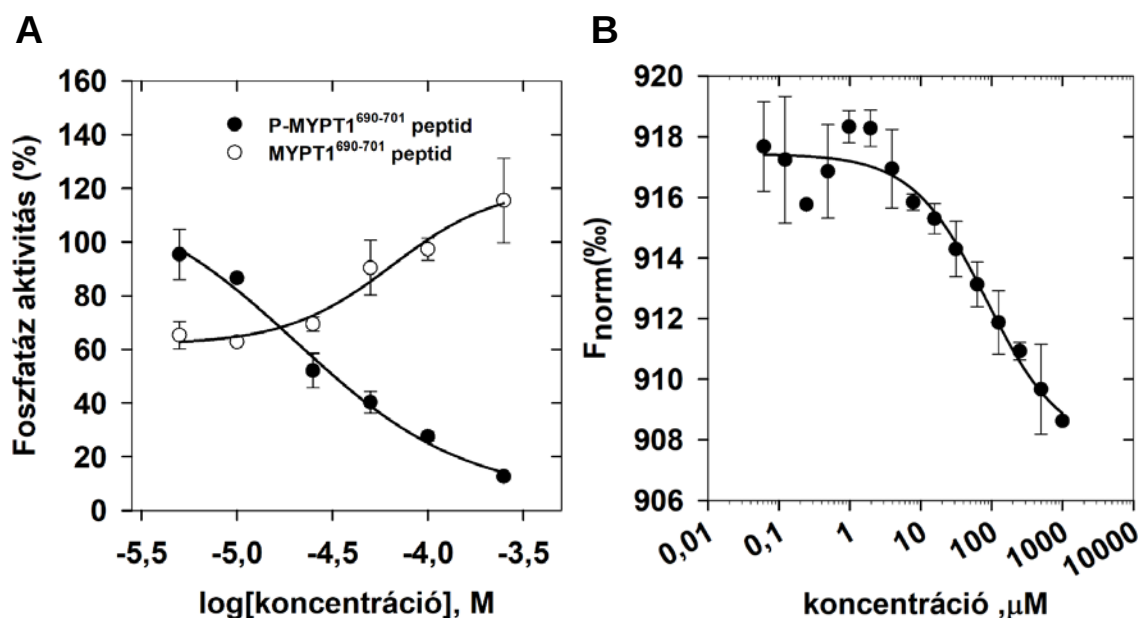
Foszforilált MYPT1 peptid és PP1c kölcsönhatásának tanulmányozása és a gátló mechanizmusok feltárása

A MYPT1, a miozin foszfatáz regulátor alegysége két olyan peptidszekvenciát is tartalmaz a fehérje C-terminális felén, amelyek foszforilációja az MP aktivitás gátlását eredményezi (Murányi és mtsai., 2005). Nem vizsgálták azonban részletesen, hogy a fehérjeszakaszok alapján szintetizált rövid, foszforilált peptidek képesek-e a PP1c-t gátlani és milyen kölcsönhatásba lépnek az enzimmel. E kérdéskör vizsgálata azért is fontos, hogy választ találjunk arra a kérdésre vajon peptidek, esetleg kombinációban más gátlószerekkel

felhasználhatók-e a PP1 gátlására. Ezért szintetizáltattuk a humán MYPT1 690-701 oldalláncait tartalmazó foszforilált (Thr696 oldalláncon, P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹) és nem-foszforilált (MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹) peptideket és tanulmányoztuk hatásukat a PP1c aktivitására, valamint vizsgáltuk kölcsönhatásukat is PP1c-vel.

A MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása a PP1c aktivitására

A 14.A ábra szemlélteti, hogy a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid gátolja a PP1c aktivitását, míg a MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid, eltekintve az 50 μ M alatti enyhe gátló hatástól az aktivitást gyakorlatilag nem befolyásolta. A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ gátló hatását $32,5 \pm 5,2$ μ M IC₅₀ érték jellemzi. Ez a PP1c és a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid közepes erősségű kölcsönhatására utal, amit MST mérésekkel is igazoltunk (14.B ábra, K_D = 85,1 μ M).

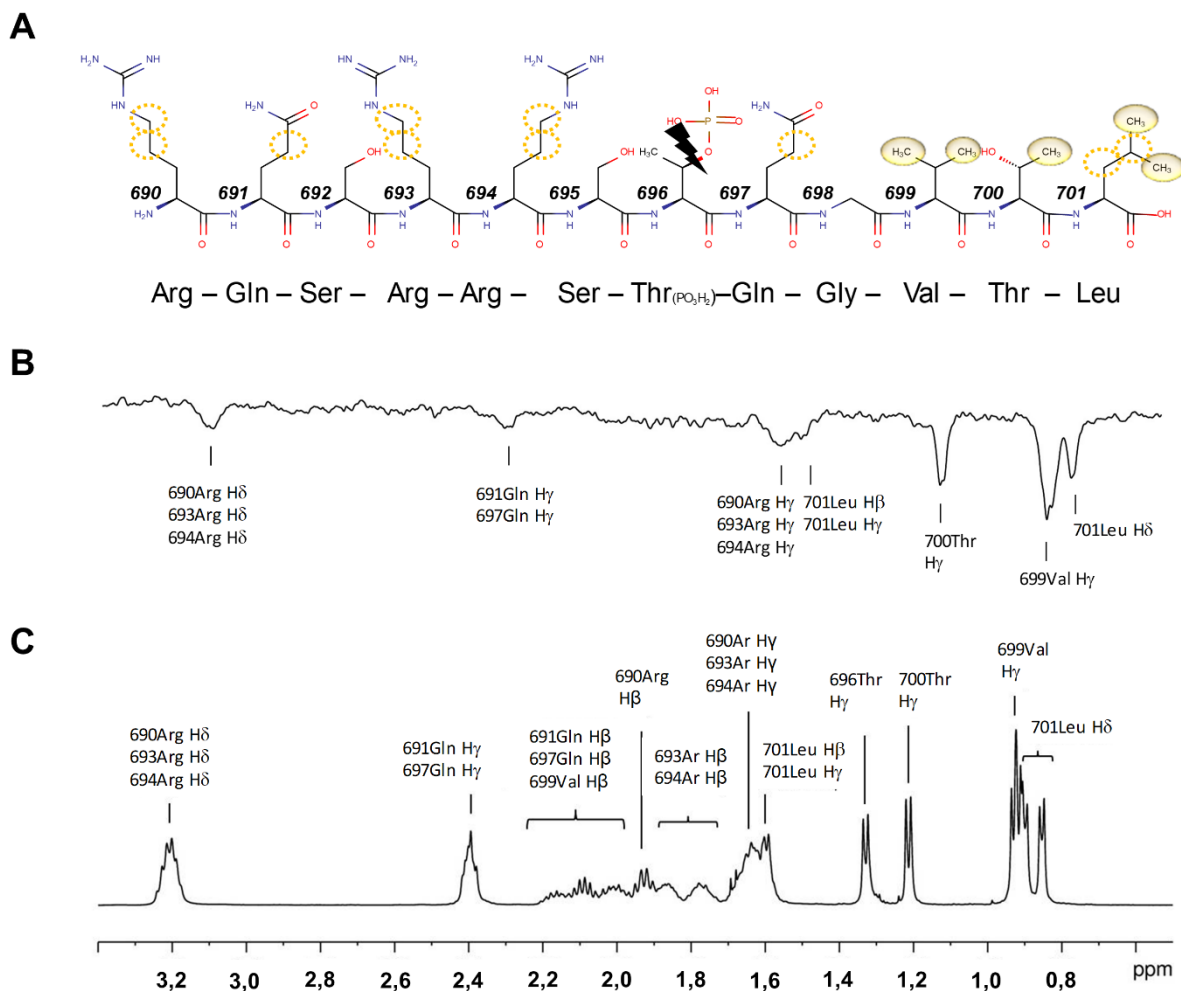


14. ábra MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása a PP1c aktivitására. A: A foszforilált és a nem foszforilált MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása a vázizom PP1c aktivitására. A PP1c aktivitását a foszforilált (●); vagy a nem foszforilált (○) peptid jelenlétében határoztuk meg az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint. A peptidek távollétében mért aktivitást tekintettük 100 %-nak. **B:** A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid-rPP1 α interakció vizsgálata mikroskalás termoforézissel (MST). A MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ foszfopeptidből hígítási sort készítettünk a PP1c fehérje jelenlétében az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően, majd a minták termoforézisét kísérő fluoreszcencia változásokat mértük és a normalizált fluoreszcenciát ábrázoltuk a koncentráció függvényében.

Kísérletet tettünk a PP1c- MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ kölcsönhatás kvantitatív meghatározására is, azonban ez esetben nem kaptunk értékelésre alkalmas MST jeleket.

Szerkezeti vizsgálatok igazolták, hogy a PP1 szubsztrátok többsége a PP1c Y-szerű szubsztrátkötő zsebének hidrofób és savas árkaihoz kötődik és ennek megfelelően a szubsztrátok is tartalmaznak hidrofób és bázikus szekvenciaregionokat (Terrak és mtsai., 2004).

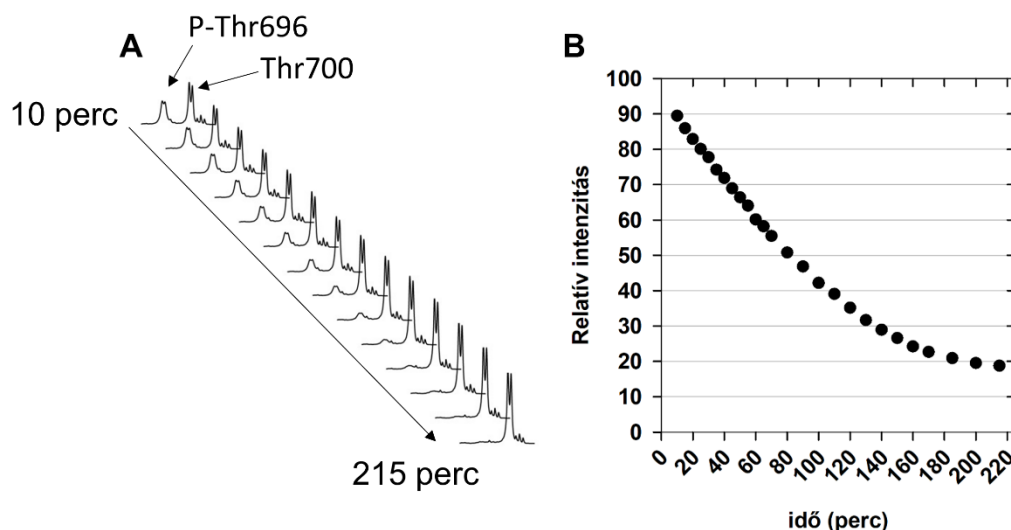
E tekintetben a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ szekvenciája a foszforilált oldallánc környezetében hasonló a P-MLC20 szekvenciájához, azzal az eltéréssel, hogy a MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidben a foszforilált oldallánc treonin, míg a MLC20-ban pedig szerin.



15. ábra PP1c-P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ kölcsönhatás kimutatása NMR telítési átviteli differencia (NMR-STD) módszerrel. A: A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ aminosavsorrendje a jelet adó protonok jelölésével (sárga). B: P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid és rPP1α (13,3-14,4 μM) NMR-STD spektruma (középső rész). C: P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid (1,3-1,5 mM) ¹H-NMR spektruma.

A PP1c-P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ kölcsönhatás pontosabb leírására NMR-STD méréseket végeztünk. A 15.C ábrán a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid ¹H-NMR spektruma látható az egyes aminosavakhoz tartozó protonjelek azonosításával. A 15.B ábra az P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹-rPP1α kölcsönhatás telítés átviteli differencia (STD) spektumát szemlélteti, amelyből látható, hogy peptid hidrofób oldalláncai (Leu, Val) és a Thr erős, míg a bázikus aminosavak (Arg), valamint a Gln gyengébb STD jeleket adtak. Ezek az adatok azonban megerősítik, hogy a peptidnek a PP1c-vel történő kölcsönhatásában a peptid hidrofób és bázikus szekvenciákat tartalmazó régiói játszanak szerepet. Ezek az adatok arra is utalnak, hogy a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid

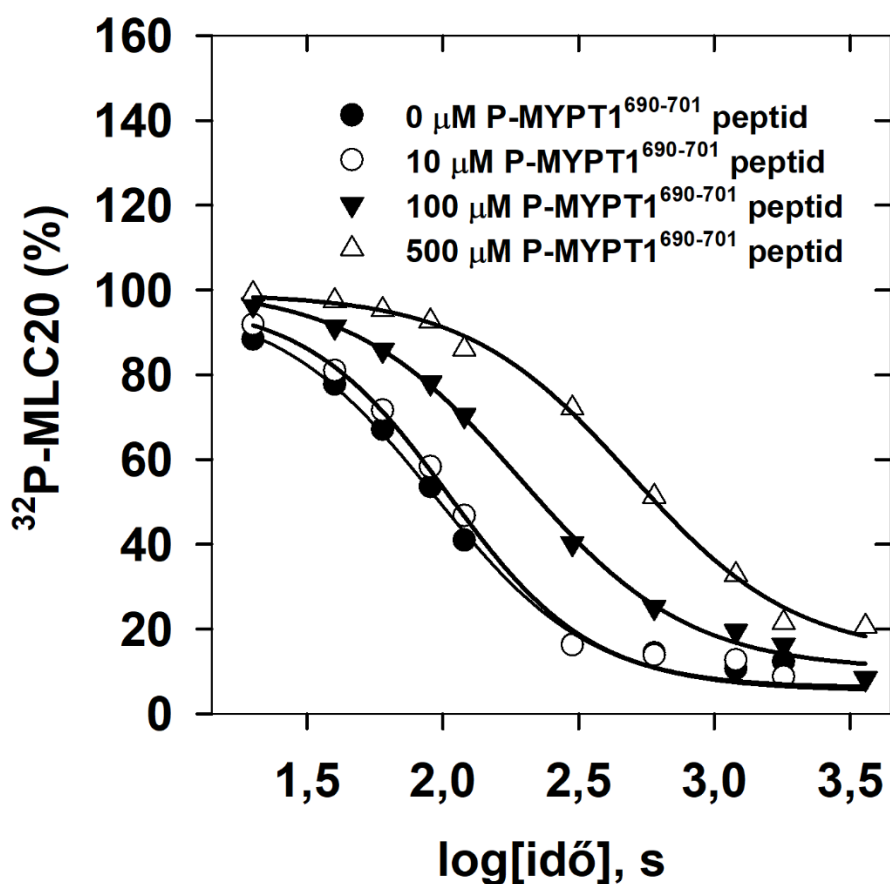
„szubsztrát-szerű” kölcsönhatást alakít ki a PP1c-vel és ezáltal gátolja az MLC20 defoszforilációját. Az NMR vizsgálatok adatai arra is utaltak, hogy a kísérlet alatt a nagy koncentrációban jelen lévő PP1c (13,3-14,4 μM) a százszoros koncentrációban jelen lévő peptidet (1,3-1,5 mM) defoszforilálta (16. ábra), igaz meglehetősen lassan ($t_{1/2} = 82$ perc).



16. ábra **A** P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid defoszforilációja az NMR-STD kísérletek alatt rPP1 α által.

A: A Thr696(-CH₃) és a Thr700(-CH₃) ¹H jelintenzitás változása az NMR-STD kísérletek kezdeti szakaszában. **B:** A Thr696(-CH₃) ¹H jelintenzitás változása az idő függvényében.

Eredményeink megerősítik azt a közelmúltban felállított hipotézist (Filter és mtsai., 2017), hogy PP1c foszforilált fehérje és peptid inhibitorai valójában az enzim „rossz (lassan defoszforilálódó) szubsztrátjai” és gátló hatásuk a fiziológias szubsztrátokkal való un. „unfair” kompetíciójuknak tulajdonítható. E feltevést bizonyítandó megpróbálkoztunk egy olyan defoszforilációs elegy összeállításával, amely közelíti az NMR vizsgálatokat és kismértékben a fiziológias viszonyokat is. Ehhez viszonylag magas koncentrációjú PP1c-t (100 nM) és szubsztrátot (10 μM P-MLC20) alkalmaztunk és tanulmányoztuk az „unfair” kompetíciót 10, 100 és 500 μM P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptiddel.

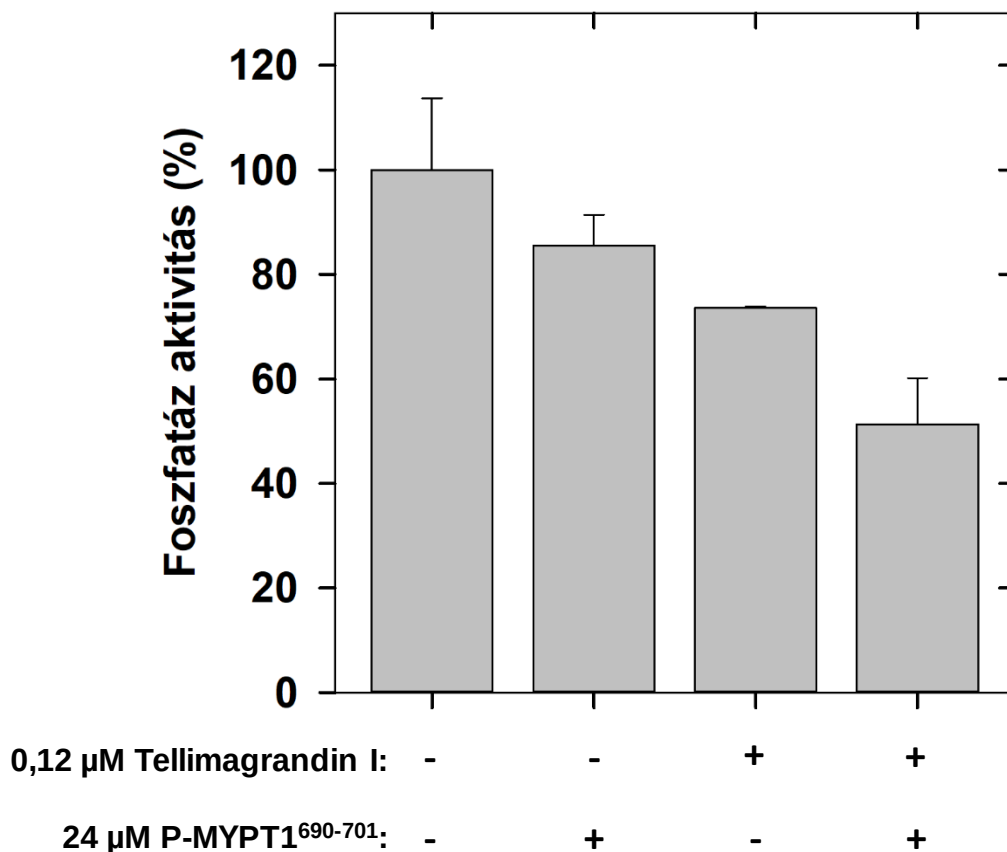


17. ábra A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid hatásának vizsgálata a ³²P-MLC20 szubsztrát defoszforilációjának felezési idejére. ³²P-MLC20-ot defoszforiláltunk PP1c-vel (100 nM) 10, 100 és 500 μM P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid jelenlétében és távollétében. A reakcióelegyekből különböző időpontokban mintát vettünk és meghatároztuk a felszabadult ³²P_i mennyiségét, amit a szubsztrát kiindulási radioaktivitásából levontunk és ezeket az értékeket az idő függvényében ábrázoltuk.

A 17. ábrán látható, hogy ilyen magas PP1c koncentrációnál a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid távollétében a P-MLC20 szubsztrát felezési ideje, $t_{1/2} = 95,5$ másodperc (s), amely 10 μM P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ jelenlétében kismértékben ($t_{1/2} = 109,64$ s), 100 μM ($t_{1/2} = 223,8$ s) és 500 μM ($t_{1/2} = 604,08$ s) P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ jelenlétében nagymértékben növekszik, egyértelmű bizonyítékként a szubsztráttal történő kompetíciónak. Az MST mérésekkel kapott rPP1c-P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ kölcsönhatás (14.B ábra) disszociációs állandó ($K_D = 85,1$ μM) és a kinetikai mérésekkel kapott IC_{50} (32 μM) értékek (14.A ábra) alapján nem meglepő, hogy a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid csak 100-500 μM koncentrációban növelte jelentősen a szubsztrát defoszforilációjának felezési idejét.

Eredményeink alapján P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ foszfopeptid nem a leghatékonyabb gátlószere a PP1c-nek, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon polifenolokkal kombinációban nem növelhető-e a gátlási hatékonyság. A polifenolok gátló hatásukat elsősorban a hidrofób szubsztrátkötő

árokkal való interakciójuk által fejtik ki, míg a P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptid a hidrofób és savas árkokhoz történő kötődésével gátol.



18. ábra A tellimagrandin I és P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ hatása a PP1c aktivitására. Vázizom PP1c higitásait előinkubáltuk P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ jelenlétében vagy távollétében 10 percen keresztül 30 °C-on, majd tellimagrandin I hozzáadását követően szintén 10 percig inkubáltuk a mintákat és a reakciókat 1 µM ³²P-MLC20 hozzáadásával indítottuk. A P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ és a tellimagrandin I távollétében mért enzimaktivitásokat tekintettük 100 %-nak, az aktivitás mérések átlagait ± SD értékeket tüntettük fel (n=2).

Hipotézisünk szerint, ha lehetséges egy PP1c-P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹-tellimagrandin I trimer komplex képződése, akkor a két gátlószer egymás hatását akár erősítheti is. A 18. ábrán látható, hogy a tellimagrandin I és a foszfopeptid együttes hatása egyszerűen összegződik, ezért a gátlószerek szinergetikus hatása kizárható. Ennek oka az lehet, hogy a két gátlószer kölcsönösen kizárja egymás kötődését, feltehetően a hidrofób árokban történő átfedő kötőhelyek által.

Szenoglikozidok foszfatazt aktiváló hatásának tanulmányozása: szerkezet-aktiváló hatás összefüggések meghatározása.

Az eredmények első fejezetében leírtak szerint az ellagitanninok, amelyek a glükóz származékainak tekinthetők foszfatazgátló sajátságokkal is rendelkeznek. E tekintetben érdekes felvetésnek tűnt, hogy a különböző csoportokkal módosított szenoglikozidok, így pl. a glikozidok nem-acetilált és acetilált formáinak hatását is tanulmányozzuk a foszfatazok aktivitására. A glikozidok általában glikozidáz enzimek gátlószereiként is alkalmazhatók és hatékonyságuk növelhető, ha az oxigént szelénnel helyettesítjük, mivel hidrolízissel szemben így ellenállóbbá válnak (Mehta és mtsai., 1995; Kumar és mtsai., 2012), Kísérleteinkben nem-acetilált és acetilált szenoglikozidokat teszteltünk a PP1 és a PP2A aktivitására.

A szenoglikozidok hatásának vizsgálata PP1c és PP2Ac aktivitására

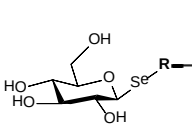
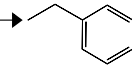
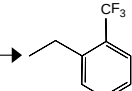
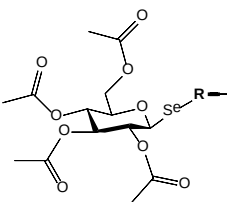
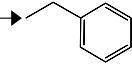
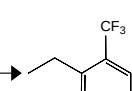
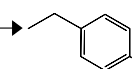
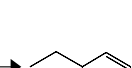
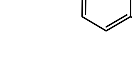
A szenoglikozidok hatását először PP1c és PP2Ac (19. ábra) aktivitására vizsgáltuk. Néhány vegyület, mint pl. a TFM-BASG, Br-BASG, MO-BASG és a BASG stimulálták mind a PP1c mind a PP2Ac aktivitását. A BSG és a TFM-BSG, vagyis a két nem acetilált származék, valamint NO₂-BASG nem volt számottevő hatással sem a PP1c sem a PP2Ac aktivitására. Az NO₂-BASG nem befolyásolta a PP2Ac, de kis mértékben gátolta a PP1c aktivitását.

Az acetilált fenil (PASG, DNO₂-PASG), feniletil (PEASG) és piridil (NO₂-PYASG, NO₂-ADPYASG) szenoglikozidok jelenlétében mért PP1c és PP2Ac aktivitásokat a 20. ábra mutatja be. A PASG és a PEASG molekulák szignifikáns mértékben stimulálták a PP1c és a PP2Ac enzimek aktivitását is, míg a nitro-származékok vagy nem mutattak aktiváló hatást, vagy kis mértékben gátolták az enzimeket.

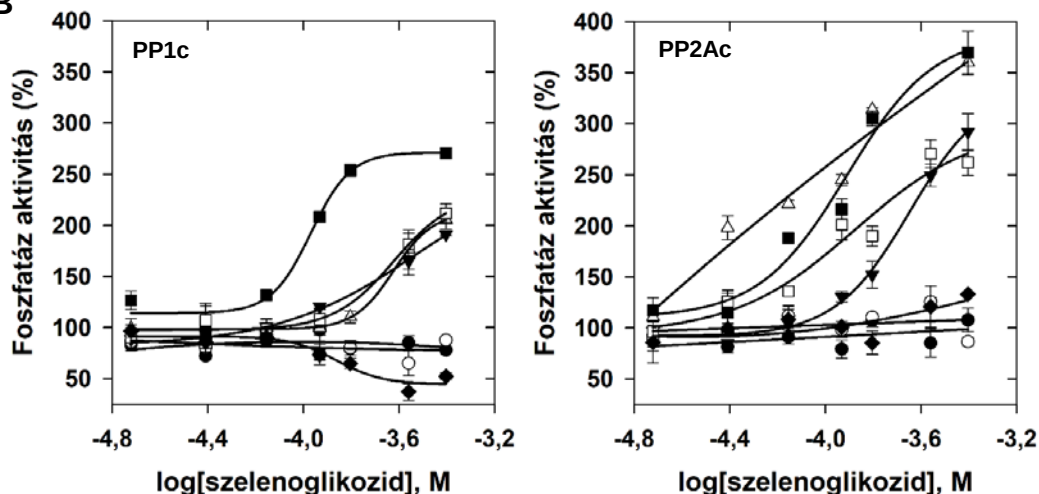
Az acetilált glikozil-szenobenzoátok (BOASG, Cl-BOASG, M-BOASG, M-ADBOASG) hatása bizonyos mértékig meglepő a PP1c és a PP2Ac enzimekre. (21. ábra). A BOASG stimulálta a PP1c aktivitását (2-szeres aktiválás), de nem mutatott hatást a PP2Ac-re. Minden más benzoil származék kis mértékben fokozta mindkét foszfataz aktivitását.

Meghatároztuk a leghatásosabb vegyületek esetén a félmaximális aktiváláshoz szükséges koncentrációkat (EC₅₀) is. Az adatok alapján a Br-BASG (EC₅₀ = 107,78 ± 2,94 µM) a leghatásosabb aktivátora a PP1c-nek, ezt követte a PEASG (EC₅₀ = 171,27 ± 14,06 µM), MO-BASG (EC₅₀ = 221,50 ± 2,07 µM), TFM-BASG (EC₅₀ = 233,22 ± 6,32 µM) és a PASG (EC₅₀ = 290,70 ± 2,45 µM). A Br-BASG (EC₅₀ = 118,93 ± 7,34 µM) kivételével a vizsgált vegyületek, mint pl. a TFM-BASG (EC₅₀ = 83,5 ± 7,34 µM), a PASG (EC₅₀ = 84,8 ± 5,66 µM), a PEASG (EC₅₀ = 103,96 ± 0,02 µM) vagy a MO-BASG (EC₅₀ = 118,83 ± 1,06 µM) jobban aktiválták a PP2Ac enzimet, mint a PP1c enzimet.

A

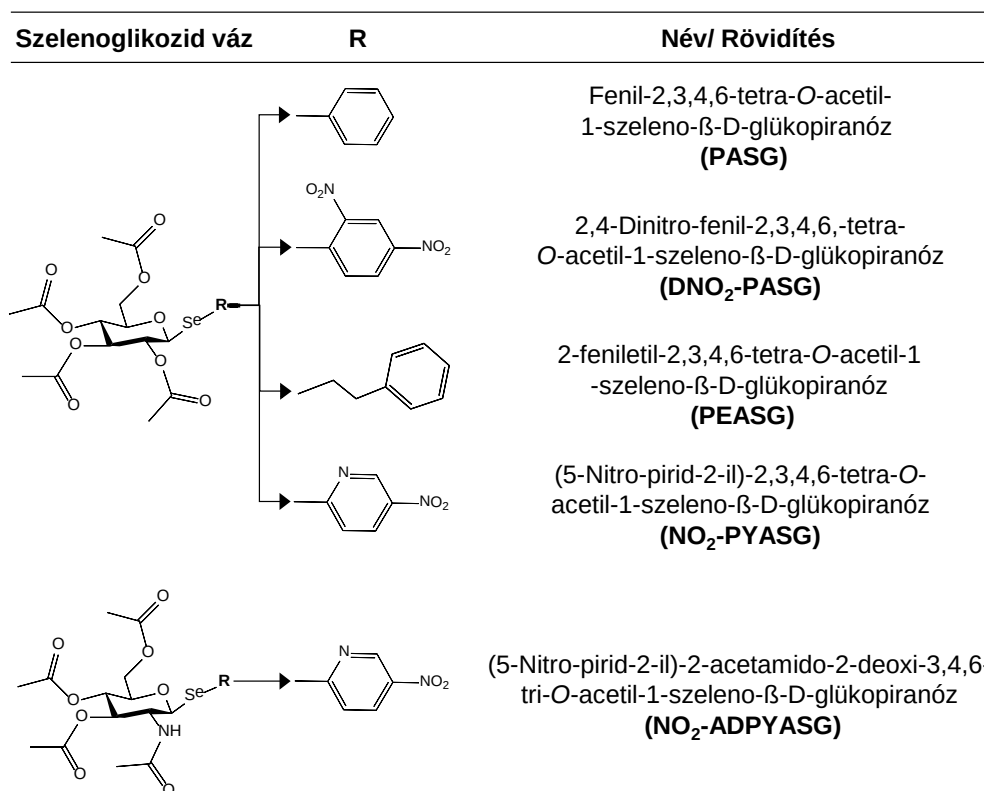
Szenoglikozid váz	R	Név / Rövidítés
		Benzil 1-szeno-β-D-glükopiranoz (BSG)
		2-(Trifluorometil)-benzil 1-szeno-β-D-glükopiranoz (TFM-BSG)
		Benzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeno-β-D-glükopiranoz (BASG)
		2-(Trifluorometil)-benzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeno-β-D-glükopiranoz (TFM-BASG)
		4-Bromobenzil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeno-β-D-glükopiranoz (Br-BASG)
		4-Metoxibenzil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeno-β-D-glükopiranoz (MO-BASG)
		4-Nitrobenzil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-szeno-β-D-glükopiranoz (NO ₂ -BASG)

B

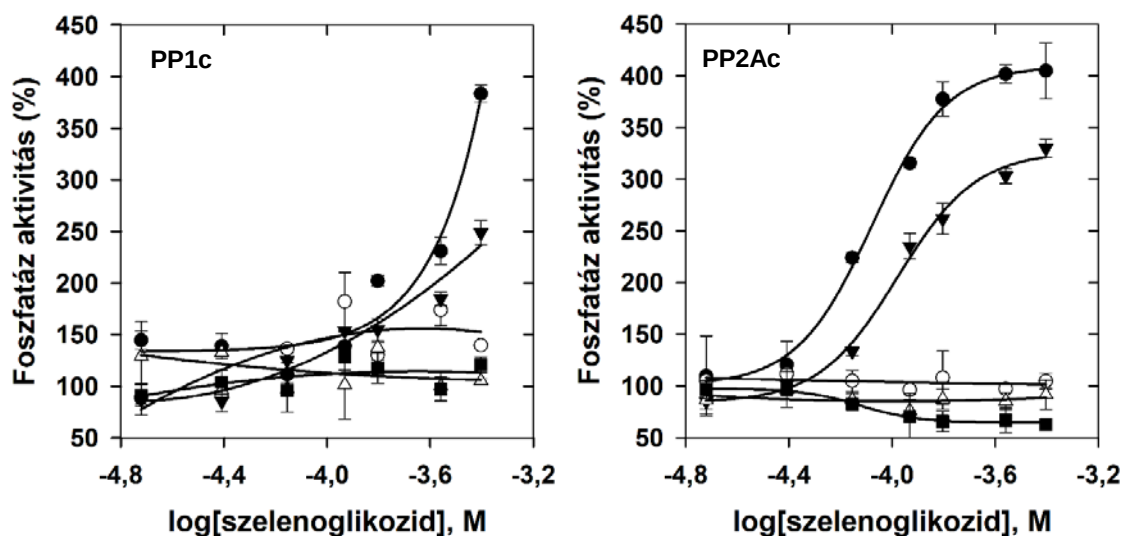


19. ábra A benzil-szenoglikozidok hatása vázizom PP1c és PP2Ac enzimek aktivitására. A: A benzil-szenoglikozidok szerkezete, elnevezésük és rövidítésük. B: Szenoglikozidok (0-395 μM) hatása a PP1c (baloldali rész) vagy PP2Ac (jobb oldali rész) aktivitására: BSG (●), TFM-BSG (○), BASG (▼), TFM-BASG (Δ), Br-BASG (■), MO-BASG (□), NO₂-BASG (◆). A selenoglikozidok távollétében mért aktivitást tekintettük 100 %-nak. Az ábrán az aktivitás mérések %-os átlagai ± SD vannak feltüntetve, n= 4-6.

A

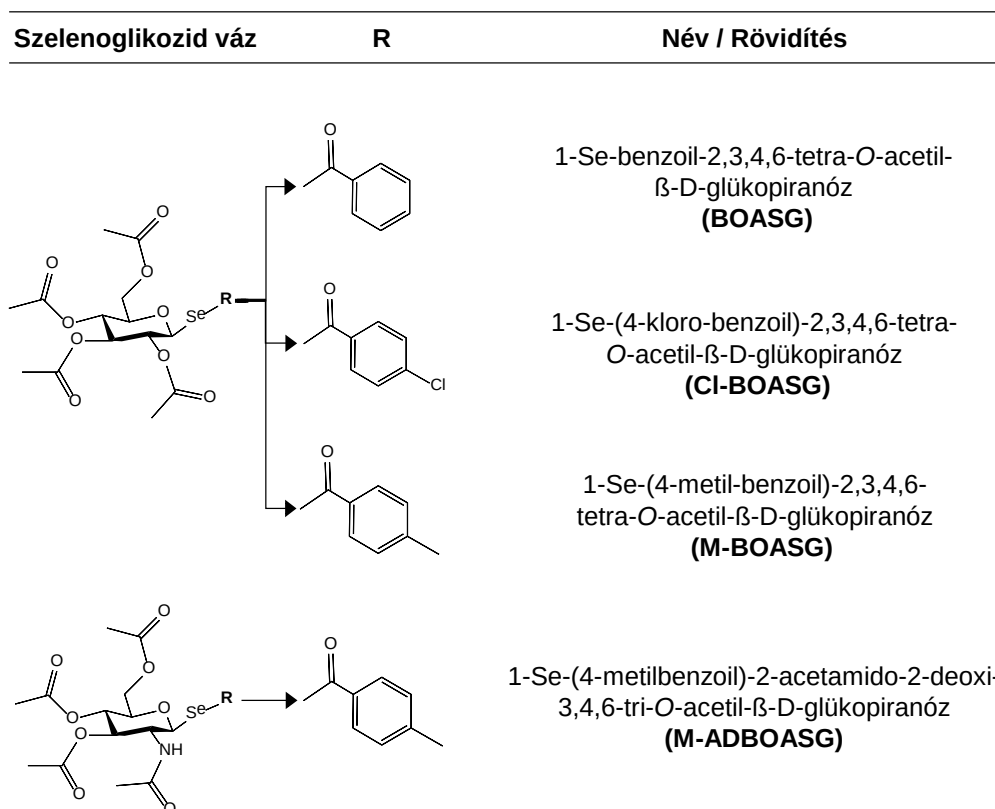


B

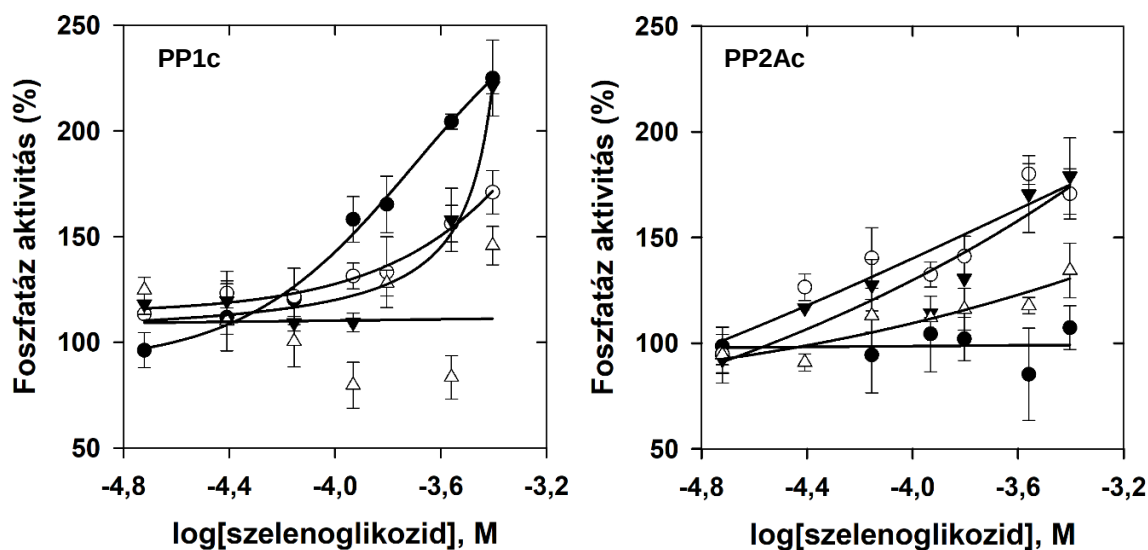


20. ábra A fenil-, feniletil-, és piridil-szenoglikozidok hatása vázizom PP1c és PP2Ac enzimek aktivitására. A: A fenil-, feniletil-, és piridil-szenoglikozidok szerkezete, elnevezésük és rövidítésük. B: Szenoglikozidok (0-395 μM) hatása a PP1c (baloldali rész) vagy PP2Ac (jobb oldali rész) aktivitására: PASG (●), DNO₂-PASG (○), PEASG (▼), NO₂-PYASG (Δ), NO₂-ADPYASG (■). A szenoglikozidok távollétében mért aktivitást tekintettük 100 %-nak. Az ábrán az aktivitás mérések %-os átlagai±SD vannak feltüntetve. n= 4-6.

A



B



21. ábra A glikozil-szelenokarboxilátok hatása vázizom PP1c és PP2Ac enzimek aktivitására. A: A glikozil-szelenokarboxilátok szerkezete, elnevezésük és rövidítésük. B: Glükozil-szelenokarboxilátok (0-395 μ M) hatása a PP1c és a PP2Ac aktivitására: BOASG (●), Cl-BOASG (○), M-BOASG (▼), M-ADBOASG (Δ). A glikozil-szelenokarboxilátok távollétében mért aktivitást tekintettük 100 %-nak. Az ábrán az aktivitás mérések %-os átlagai $\pm$ SD vannak feltüntetve. n= 4-6.

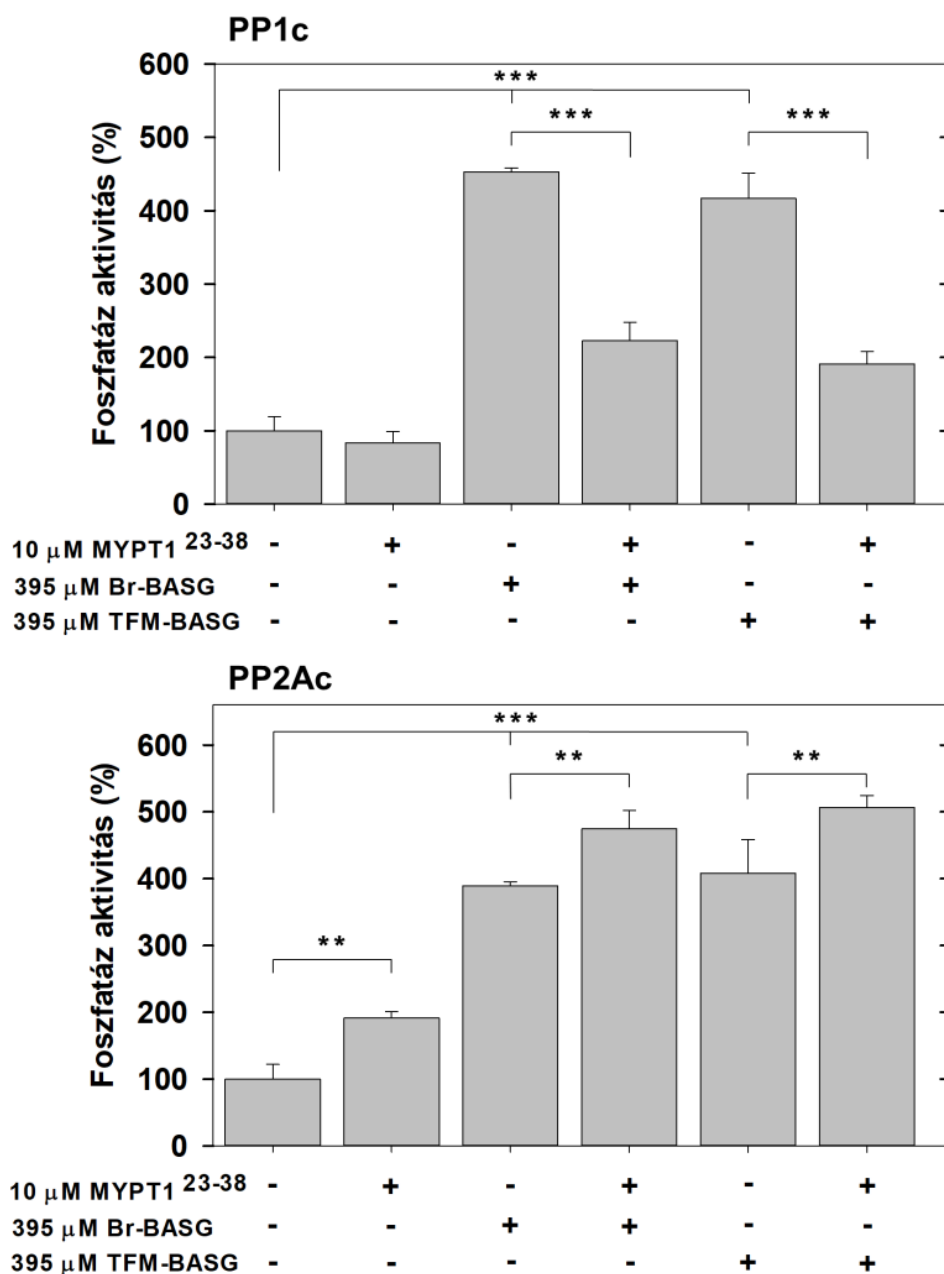
Az aktiváció mértékében a fenti aktivátorok nem különböznek jelentős mértékben sem a PP1c-re sem a PP2Ac-re, és az EC₅₀ értékek is egy szűkebb koncentráció tartományban vannak mindkét esetben (100-300 μ M PP1c-nél, 80-120 μ M PP2Ac-nél).

A szerkezet-hatás összefüggéseket vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a vegyületek glükóz egységében a hidroxil csoportok acetilálása szükséges a foszfatáz aktiváláshoz. Az adatok alapján tehát a vegyületek hidrofobicitásának fokozása kedvezően hat az aktiváló készségre.

Ugyanakkor, ha megvizsgáltuk a (szubsztituált) benzoil csoportal rendelkező BOASG, Cl-BOASG, M-BOASG vagy a M-ADBOASG (21. ábra) vegyületeket, ahol poláris csoportot hordozó szerkezeti elemet kapcsolunk a szelénhez, illetve az elektron-szívó (NO_2 -) csoportot tartalmazó aromás szelenoglikozidokat (DNO_2 -PASG, NO_2 -PYASG, NO_2 -ADPYASG, 20. ábra), akkor arra következtethetünk, hogy vagy nem voltak hatással, vagy gátló hatást fejtenek ki a foszfatáz aktivitásra. A fenti adatok tehát arra utalnak, hogy a szelenoglikozidok kötődésében nagy valószínűséggel a PP1c és a PP2Ac fehérjék hidrofób felszínei vesznek részt.

Kompetíció a szelenoglikozidok és az RVxF PP1c-kötő motívumot tartalmazó peptid között a PP1c-hez való kötődésben

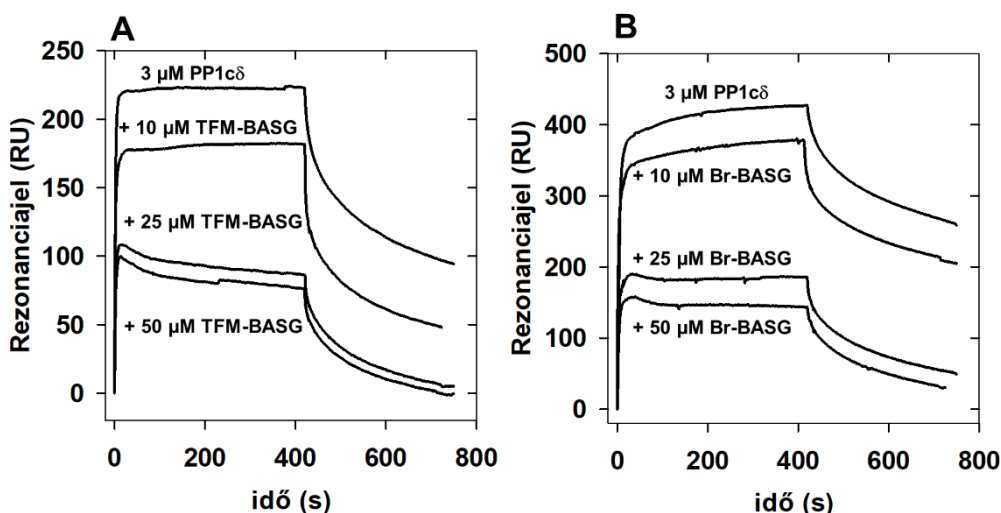
A gátló és szabályozó fehérjék kötőhelyei, amelyek a PP1 (Yang és mtsai., 2000; Terrak és mtsai., 2004) és a PP2A (Xu és mtsai., 2006; Cho és mtsai., 2007) holoenzim képzésében és működésében vesznek részt jól ismertek. A kisméretű molekulák által kiváltott aktiváció szerkezeti hátterét PP1 esetében jobban feltárták (Tappan és mtsai., 2008; Chatterjee és mtsai., 2013), ezért kísérleteink során a PP1-re fókuszáltunk. Korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy a peptidek (Tappan és mtsai., 2008; Chatterjee és mtsai., 2012) valamint a mikrocisztin származékok (Tappan és mtsai., 2008) úgy fejtenek ki aktiváló hatást a PP1-re, hogy a szabályozó fehérjék RVxF motívumának kötőhelyét foglalják el a fehérje felszínén. Ezek alapján a hipotézisünk az volt, hogy a szelenoglikozidok aktiváló hatásukat az RVxF PP1c-kötő motívum kötőfelszínével interakcióban fejtik ki. Ezért a MYPT1-ből származó MYPT1²³⁻³⁸ (35KVKF38 RVxF motívumot tartalmazó) peptid jelenlétében vizsgáltuk a TFM-BASG és a Br-BASG aktiváló hatását PP1c-re illetve-PP2Ac-re. Korábban már leírták, hogy a MYPT1²³⁻³⁸ peptid nem aktiválja a PP1c-t, az utóbbi eredményt kísérletesen mi is megerősítettük (22. ábra). Ha azonban a PP1c-t a MYPT1²³⁻³⁸ peptiddel előinkubáltuk, a TFM-BASG és a Br-BASG által kiváltott aktiváció mértéke csökkent, de nem szűnt meg teljesen. A MYPT1²³⁻³⁸ peptid e részleges aktivációt gátló hatása nem fokozódott akkor sem, ha a kísérletekben alkalmazott 10 μM koncentrációnál nagyobb (25 μM) MYPT1²³⁻³⁸ peptid koncentrációt alkalmaztunk.



22. ábra A MYPT1²³⁻³⁸ hatása a Br-BASG és a TFM-BASG által kiváltott PP1c és PP2Ac aktivációra. PP1c-t (felső ábrarész) vagy PP2Ac-t alsó ábrarész) előinkubáltuk 10 μ M MYPT1²³⁻³⁸ peptid jelenlétében vagy távollétében 10 percig, amit 395 μ M Br-BASG vagy TFM-BASG szelenoglikozid jelenlétében vagy távollétében további 10 perc inkubálás követett. A reakciót 1 μ M ³²P-MLC20 szubsztrát hozzáadásával indítottuk és a foszfataz aktivitást az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint határoztuk meg. A peptid és a vegyületek távollétében mért aktivitások átlagát tekintettük 100 %-nak, és a peptid és a vegyületek jelenlétében kapott aktivitások %-os értékeinek átlagait $\pm$ SD tüntettük fel oszlopdiagrammok formájában. Szignifikancia: ANOVA *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. n = 4.

Ugyanakkor, a MYPT1²³⁻³⁸ peptid a PP2Ac enzim aktivitását szignifikánsan növelte és nem gátolta a TFM-BASG vagy a Br-BASG által kiváltott aktivációt, sőt a peptid és a szelenoglikozid aktiváció a PP2Ac esetén additívnek tűnt (22. ábra).

Az eddigi eredményeinkből kiindulva a MYPT1²³⁻³⁸ peptid és a szelenoglikozidok közötti vetélkedést a közös kötőhelyért felületi plazmon rezonancián alapuló kötődési módszerrel is igazolni kívántuk. E kísérletekhez GST-MYPT1 fehérjét immobilizáltunk a szenzorchip felszínén és vizsgáltuk a rPP1c δ kötődését ehhez a felszínhez, ami valójában a PP1c-MYPT1 holoenzim képződésének felel meg (23. ábra).



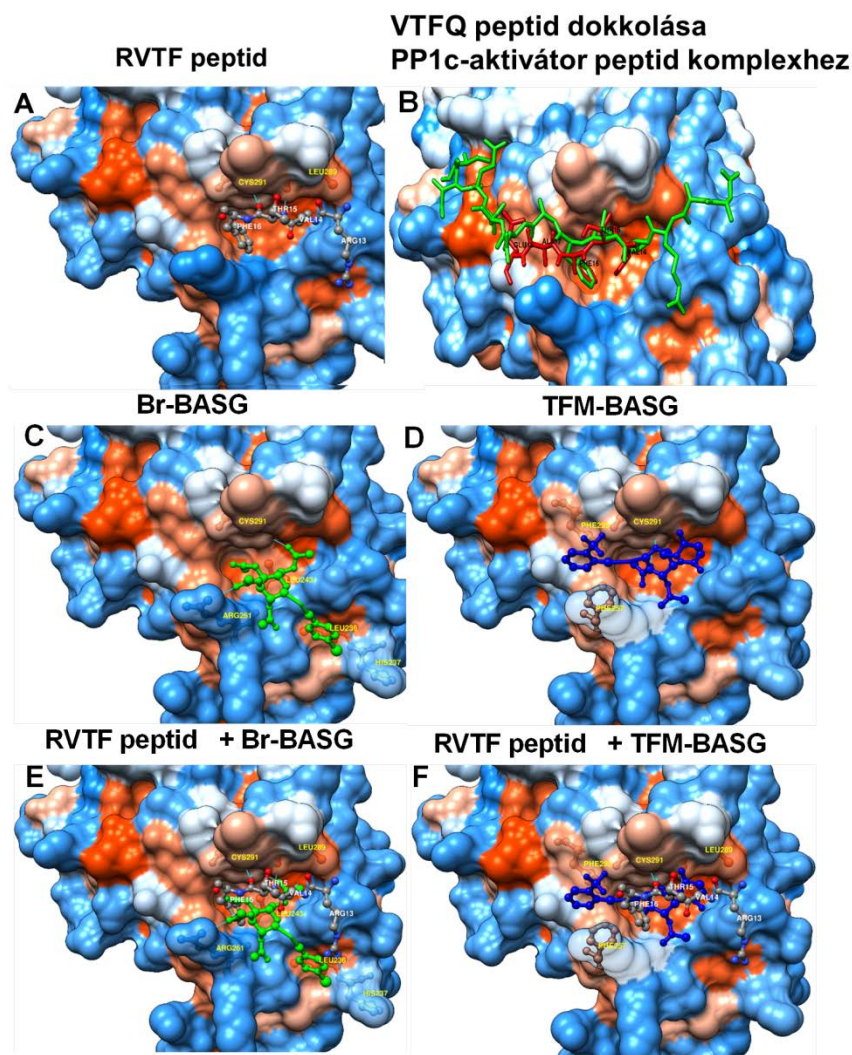
23. ábra A TFM-BASG és a Br-BASG hatásának vizsgálata a PP1c δ -MYPT1 komplex képződésére felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési módszerrel. A GST-MYPT1 fehérjét immobilizáltuk szenzor chip felszínén anti-GST antitesten keresztül, majd 3 μ M rPP1c δ oldatot áramoltattunk keresztül a chip felszínén a TFM-BASG (A) és a Br-BASG (B) különböző koncentrációinak (0-50 μ M) jelenlétében vagy távollétében. Két-két kötődési kísérletben (n=2) hasonló eredményt kaptunk az ábrán -egy reprezentatív kötődési kísérlet eredménye látható.

A Br-BASG és a TFM-BASG részlegesen gátolta a rPP1c δ kötődését a GST-MYPT1-hez (23.A és B ábra). Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a MYPT1 RVxF motívuma esszenciális a PP1c δ -MYPT1 interakcióhoz, valamint a MYPT1 felületén lévő további kötőhelyek (MyPhoNE, ankirin-szerű ismétlődések) kapcsolódásához (Tóth és mtsai., 2000). Eredményeink alapján feltehető, hogy a szelenoglikozidok aktiváló hatásukat valószínűleg a PP1c RVxF kötő felszínével való kölcsönhatásuk révén fejtik ki, azonban az aktiváló hatással és a kötődéssel szemben kifejtett részleges kompetíció arra utalhat, hogy a kötőhelyek átfedése nem teljes.

A szelenoglikozid-PP1c interakció modellezése molekula dokkolással

Molekuladinamikai szimulációkat végezve szelenoglikozid vegyületeket dokkoltunk egy olyan röntgenkristallográfiás szerkezetből származó PP1c szerkezetet alapul véve, ahol a

fehérjét egy RVxF motívumot tartalmazó peptiddel kristályosították (24.A ábra) (Egloff és mtsai., 1997; Chatterjee és mtsai., 2012).



24. ábra A szelenoglikozidok dokkolása a PP1c RVxF motívumkötő zsebéhez. A PP1c MYPT1 (RVxF-et tartalmazó) peptiddel alkotott krisztallográfiás szerkezetéből kiindulva (A) a peptid rövidített formájának PP1c-hez dokkolásával validáltuk a szimulációt (B), majd a műveletet elvégeztük a Br-BASG (C) és a TFM-BASG (D) vegyületek szerkezetével, és a legnagyobb affinitású kötődéseket összehasonlítottuk a krisztallográfiás szerkezet segítségével feltárt peptid-kötő felszínnel (E; F).

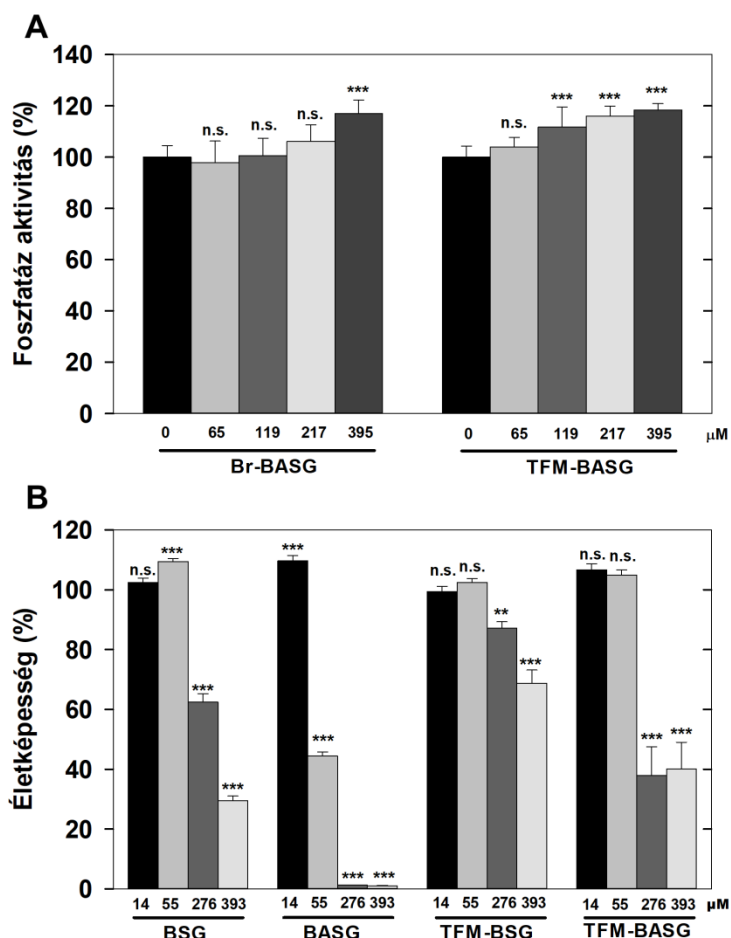
Az RVxF motívum kötődésében a motívumban található Phe és Val aminosav oldalláncok játszanak fontos szerepet. A Phe-t a PP1c felszínén a Leu243, Phe257, Cys291 és a Phe293 aminosavak koordinálják, míg a Val kötődésében az Ile169, Leu243, Leu289 és a Cys291 oldalláncok játszanak szerepet (24. A ábra) (Egloff és mtsai., 1997). A kísérletek során végzett dokkolási szimulációkat egy olyan aktiváló peptid rövidített formájára ($^{14}\text{Val-Thr-Phe-Glu}^{18}$) normalizáltuk, amelynek a PP1c-vel képzett kristályszerkezete ismert volt (24.B ábra). A peptid dokkolása során az RVxF motívum Phe és a Val oldalláncaira kapott kötő felületek, illetve a kötődésben részt vevő aminosav oldalláncok a PP1c részéről nagyban megegyeztek a

krisztallográfiás szerkezet elemzéséből származó adatokkal. A kötődési energiák a dokkolt rövid peptidnél -5,6 kcal/mol és -5,1 kcal/mol értékek közé estek a kötődés pozíciójától függően. Elvégeztük a szimulációkat a TFM-BASG és a Br-BASG vegyületekkel is és összehasonlítottuk a kapott kötődési felszíneket a peptid esetében kapott pozíciókkal. Az eredmények azt mutatták, hogy a Br-BASG (24.C és E ábra) és a TFM-BASG (24.D és F ábra) a peptiddel átfedő, viszont bizonyos mértékig eltérő pozíciókat preferál a PP1c felszínén. A Br-BASG acetilált glükopiranoz gyűrűje részben kötődött az RVxF motívum megkötésében részt vevő hidrofób árokba. A kötődést a Cys291 és az Arg261 oldalláncok hidrogén hidakon keresztül, míg a Leu243 hidrofób interakción keresztül stabilizálta (24.E ábra). A Br-szubsztituált vegyület aromás gyűrűje viszont egy olyan hidrofób felszínhez kötődött, amely nem vet részt az RVxF megkötésében, az interakcióját a Leu236 és a His237 oldalláncokkal kialakított kölcsönhatás stabilizálta. A TFM-BASG kötőhelyei viszont nagyobb átfedést mutattak az RVxF kötőhelyével, illetve a kötődésben részt vevő aminosavak is átfedtek (Cys291; Phe293 és a Phe257) (24.F ábra). A kötődések pozícióihoz számított energiák csak kis mértékben különböztek (-5,2 kcal/mol és -5,0 kcal/mol között a Br-BASG esetében; -5,6 kcal/mol és -5,4 kcal/mol között a TFM-BASG esetében) a VTFQ peptidnél kapott tartománytól. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a RVxF motívum, valamint a TFM-BASG és Br-BASG kötőhelyeik szignifikáns, de nem teljes átfedését mutatnak, ami alapján arra következtettünk, hogy ezek a partnerek befolyással lehetnek egymás kötődésére a PP1c felszínéhez.

A szelenoglikozidok hatása HeLa sejtek életképességére és foszfatáz aktivitására

A szelenoglikozidok jelenlétében megvizsgáltuk a HeLa sejtek foszfatáz aktivitását és életképességét. A Br-BASG és a TFM-BASG 65-395 μM koncentráció tartományban alkalmazva kismértékű, de szignifikáns növekedést váltott ki a HeLa sejtek foszfatáz aktivitásában 1 óra kezelés után (25.A ábra). A Br-BASG csak 395 μM koncentráció mellett volt hatásos, míg a TFM-BASG már 100 μM felett szignifikánsan növelte az aktivitást. A nem acetilált vegyületek nem okoztak eltérést a kontrol aktivitásokhoz képest 1 óra kezelést követően. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a szelenoglikozidok képesek a sejtek membránján keresztüljutva, igaz mérsékelt foszfatáz aktivációt kiváltani a sejteken belül. Mivel a megfigyelt hatás koncentráció-függést mutat, ezért a vegyületek membrán-permeabilitása komoly tényezője lehet a megfigyelés hátterében lévő eseményeknek. Szintén fontos részlet, hogy a PP1 és PP2A a sejtekben holoenzim formában találhatóak meg, de a szelenoglikozidok hatását eddig a katalitikus alegységekre mutattuk ki. A szelenoglikozidok

kötőhelye átfedhet a regulátor alegységek interakciós felületével, ezért az utóbbiak befolyásolhatják ezek aktiváló hatását a holoenzimekre.



25. ábra A szelenoglikozidok hatása HeLa sejtek foszfatáz aktivitására és életképességére. (A): A sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk a Br-BASG és a TFM-BASG jelenlétében (0-395 µM). A sejtek mosását és lizálását követően meghatároztuk a foszfatáz aktivitást 1 µM ³²P-MLC20 szubsztráttal az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint. A kezeletlen sejtek aktivitás átlagát 100 %-nak tekintettük, és a kezelt sejtek aktivitás átlagait ennek függvényében fejeztük ki a szórás feltüntetése mellett (SD). n= 5. (B): A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a BSG, BASG, TFM-BSG és TFM-BASG jelenlétében (0-393 µM) vagy távollétében (kontroll), majd meghatároztuk a sejtek életképességét Alamar Blue esszé segítségével. A kezeletlen sejtek életképesség méréseinek átlagát 100 %-nak tekintettük és a kezelt sejtek életképességét ennek függvényében fejeztük ki a szórás adatokat feltüntetve (SD). n= 3. A mérések szignifikanciáját ANOVA módszer segítségével határoztuk meg: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, n.s.: nem szignifikáns.

Az acetilált (BASG, TFM-BASG) és a nem acetilált (BSG, TFM-BSG) szelenoglikozidok is csökkentették az életképességet, azonban az acetilált vegyületek nagyobb mértékű sejthalált idéztek elő (25. ábra).

A TFM-BASG csak kis mértékben képes aktiválni a HeLa sejtekben a foszfatázokat, ezért túlzás lenne azt állítani, hogy az életképességben mérhető eltérések az acetilált és a nem

acetilált vegyületek között a foszfatáz aktivációnak lennének tulajdoníthatók. Valószínűsíthető azonban, hogy ebben a foszfatáz aktiválásnak is szerepe van, de feltehető, hogy számos eddig ismeretlen tényező is szerepet játszik a szelenoglikozidok sejtekre gyakorolt hatásában.

Eredmények megbeszélése

A PP1 és PP2A szabályozása ellagitanninokkal

Eredményeink alapján az ellagitanninok gátolják a PP1c és PP2Ac enzimek aktivitását és a gátlásban nagyobb szelektivitást mutatnak a PP1c, mint a PP2Ac iránt. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a szerkezetileg rokon gallotannin PGG, valamint a katechin típusú EGCG (5. ábra) hasonló módon gátolta a PP1c és PP2Ac enzimeket (Kiss és mtsai., 2013) azzal a különbséggel, hogy a vegyületek szelektivitása kisebb mértékű volt, mint az ellagitanninok esetén (1. táblázat). Ennek hátterében szerkezetből adódó eltérések állhatnak. Az itt vizsgált ellagitanninok abban különböznek a PGG-től, hogy egy vagy két kovalensen kapcsolt hexahidroxidifenil csoportot tartalmaznak. A mahtabin A-ban a glükóz mindegyik hidroxil csoportja észteresített, ebben tehát a PGG-re hasonlít és a foszfatázgátló hatásuk is hasonló. Ezzel szemben a többi ellagitannin szabad hidroxil csoportot is tartalmaz, amely a tellimagrandin I, pedunculagin és a praecoxin B esetében a glikozidos hidroxil, míg a GHG-ben ez a glükóz 3. szénatomján található -OH. Ezen kívül az ellagitanninok különböznek a hexahidroxifenil csoportok pozíciójában és számában. Feltehető tehát, hogy a különböző gátló hatások a fenti szerkezeti különbségeknek tulajdoníthatók (6. ábra).

Ha összevetjük a szerkezetben megfigyelhető különbségeket a mért hatásokkal, látható, hogy a hexahidroxidifenil csoport pozíciója a szerkezetben meghatározza a PP1c enzimre kifejtett gátló hatás mértékét. A tellimagrandin I molekula szerkezetének forgási szabadsági foka alacsonyabb, mint a PGG molekulának a 4,6-hexahidroxidifenil csoportnak tulajdoníthatóan, így szerkezete merevebb és a PP1c aktivitását is hatékonyabban gátolja. A tellimagrandin I glikozidos hidroxilcsoportja nem észteresített, ez akár a fokozottabb gátlás kialakulásához is hozzájárulhat. A mahtabin A, amelyben a glikozidos hidroxil észteresített, gyengébb gátló hatást fejt ki a PP1c-re mint a tellimagrandin I, viszont a hexahidroxidifenil csoportot 2,3- pozícióban tartalmazza, míg a tellimagrandin I-ben 4,6-hexahidroxidifenil egység található. A tellimagrandin I a praecoxin B-nél hatékonyabb gátlószer és úgy tűnik az eltérő gátló hatás a hexahidroxifenil csoportok eltérő pozíciójának tulajdoníthatók. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a hexahidroxidifenil csoportoknak tulajdonítható részleges szerkezeti merevség, valamint e csoportok pozíciója a molekulában a gátló hatást befolyásoló fontos tényező. Ugyanakkor a túlzott merevség a gátló hatás csökkenését vonja maga után, ugyanis a pedunculagin, amely két hexahidroxidifenil csoportot is tartalmaz az ellagitanninok közül a leggyengébb gátló hatást fejtette ki a foszfatáz aktivitásra. Egy másik gátlást befolyásoló tényező lehet a nem észteresített hidroxil csoport helyzete. Ha a tellimagrandin I-

et, mint hatásosabb inhibitort összevetjük a GHG-vel, ahol mindkét vegyületben 4,6-hexahidroxidifenil csoportot találunk, de eltérő pozíciójú hidroxil csoportokat, akkor arra következtethetünk, hogy gátló hatékonyságot a szabad hidroxil csoport pozíciója is befolyásolja.

Az ellagitanninok a PP1c-t a PGG-hez hasonló hatékonysággal gátolják, viszont a PP2Ac-re kifejtett gátló hatásuk sokkal mérsékeltebb (7. ábra). Ez a tulajdonság tükröződik az ellagitanninok PP1c-re és PP2Ac-re meghatározott IC_{50} értékeinek arányában (szelektivitási arány), amely $PP1c/PP2Ac = 1: 80/97$ az ellagitanninokra és $1: 17$ a PGG-re. Korábban az EGCG-vel és PP2Ac röntgenkristallográfiás szerkezetén (Xing és mtsai., 2006) alapuló 3D modellel kivitelezett molekuladinamikai szimulációk (Kiss és mtsai., 2013) arra hívták fel a figyelmet, hogy a PP2Ac esetén az EGCG hidrofób szubsztrát-kötő árkához való kapcsolódását egy, az árok közelében lévő sóhíd jelentősen csökkentheti. Mivel az ellagitanninok az EGCG-től lényegesen nagyobb méretűek a kölcsönhatás e gátja ezen molekulák esetén is feltételezhető.

Az NMR-STD analízissel feltárt eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az ellagitanninok aromás gyűrűinek hidrofóbicitása a PP1c-vel történő kölcsönhatás fontos tényezője (9. ábra). Korábbi, a PGG-re kapott adataink alapján feltételezhető, hogy e kölcsönhatásokat hidrogénkötések kialakításával a vegyületek fenolos hidroxil csoportjai is stabilizálják (Kiss és mtsai., 2013). Habár a hidroxilcsoportok szerepét a kölcsönhatásban az ellagitanninok esetében kísérletesen nem erősítettük meg, más közlemények is arra utalnak, hogy a polifenolok hidroxilcsoportjainak alapvető szerepe van a fehérjékkel való kölcsönhatásban (Nakano és mtsai., 2018). Az NMR-STD módszerrel kimutatott tellimagrandin I-PP1c kölcsönhatást további kötődési módszerekkel (ITC, SPR és MST) kvantitatív módon is jellemeztük (9. és 10. ábra). A kölcsönhatást jellemző K_D értékek az alkalmazott módszertől függően $0,23-1,78 \mu M$ között voltak, ezek az értékek jó egyezést mutatnak az enzimkinetikai mérésekkel kapott IC_{50} értékekkel. Fontos megjegyezni, hogy korábban a PGG és az EGCG PP1c-hez történő kötődésének SPR módszerrel való vizsgálatánál kimutattuk, hogy ezek a polifenolok, habár a PP1c felületén egyetlen kötőhelyük van, a sztöchiometriai $1: 1$ aránynál jóval nagyobb arányban képesek a felületen immobilizált PP1c-hez kötődni. Ez a „stacking” jelenség, amely számos polifenol molekula 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 (Kiss és mtsai., 2013; Ismail és mtsai., 2016). Az ellagitanninokkal végzett SPR kísérletek során kapott szenzogramok alapján azt feltételezzük, hogy ezek a molekulák is hasonló módon viselkednek az alkalmazott kísérleti körülmények között.

Több közlemény is foglalkozott az ellagitanninok biológiai hatásaival, Ismail a különböző rákos sejtekre gyakorolt terápiás hatásokat foglalta össze visszatekintésében (Ismail és mtsai., 2016). Eredményeink szerint a tellimagrandin I csökkentette a HeLa sejtek életképességét és foszfatáz aktivitását (11. ábra), ezzel szemben a mahtabin A hatástalannak bizonyult. A különbségek hátterében a tellimagrandin I és a mahtabin A eltérő membrán-permeabilitása állhat. Azt a kérdést, hogy ez a permeabilitási különbség két szerkezetileg hasonló molekula között hogyan jön létre HeLa sejteken jelen kísérleteink alapján nem tudjuk megválaszolni. Különösen nehéz bármilyen hipotézist felállítani annak a fényében, hogy a membránnal körülvett szinaptoszómákon ezek a vegyületek ellentétesen hatnak. A mahtabin A növeli az egér kortikális szinaptoszómáiban a SNAP-25^{Thr138} foszforilációját és csökkenti a KCl által kiváltott exocitózis mértékét, míg a tellimagrandin I hatástalan (12. és 13. ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az ellagitanninok képesek intracelluláris P-Ser/Thr szubsztrátok defoszforilációját gátolni befolyásolva ezzel a kapcsolódó szabályozó folyamatokat, de az ellagitanninok sejtfüggő hatásainak kiderítésére további vizsgálatokat kell végezni.

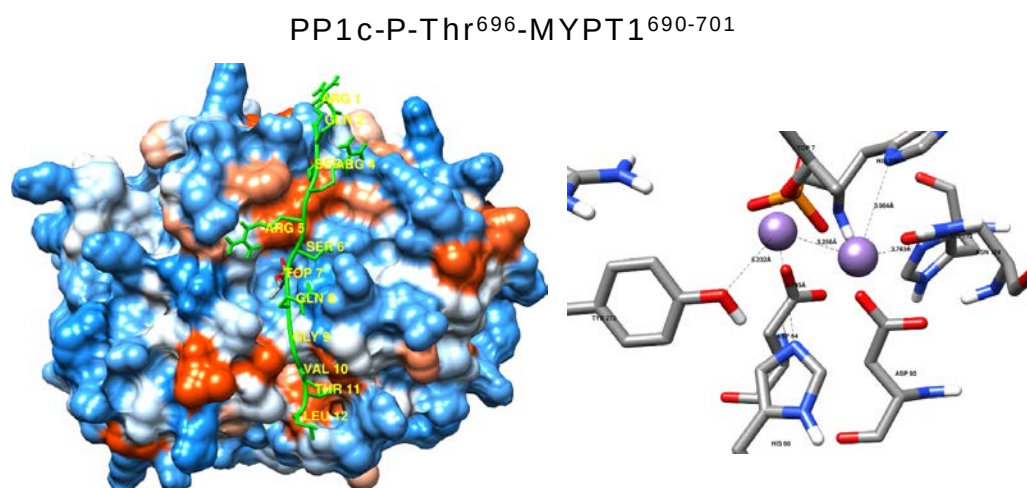
Összességében az ellagitanninok a PP1 és PP2A inhibitorok új családját képviselik a PP1-re kifejtett fokozottabb gátlási preferenciával. A kvantitatív kötődési vizsgálatok közepes stabilitású kölcsönhatást mutattak ki a PP1c és a tellimagrandin I között, ami a PP1c hidrofób szubsztrát kötő árka és a tellimagrandin I aromás gyűrűinek kölcsönhatásával, valamint a fenolos hidroxil csoportok által kialakított hidrogén kötések révén alakul ki. Az ellagitanninok sejten belüli célpontjait még nem derítették fel minden részletében. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a polifenolok által kiváltott hatásokért részben a PP1 gátlása lehet felelős.

A MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ és a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidek hatása PP1c-re

Megkíséreltük jellemezni a miozin foszfatáz regulátor alegységéből (MYPT1) származó gátló hatású foszforilált peptid PP1c-t gátló sajátosságait. Eredményeink szerint 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 igazán ígéretes foszfatázgátló molekulaként vehető számításba (14. ábra). 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 (15. ábra). Másrészt igazolódott az is, hogy a PP1c ($10-14 \mu M$) és a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ ($1,3 mM$) ilyen magas koncentrációjánál az NMR kísérletek alatt a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ defoszforilálódik, igaz

meglehetősen hosszú felezési idővel ($t_{1/2} = 82$ perc) (16. ábra). Mivel a kölcsönhatásban résztvevő aminosav oldalláncok a defoszforilált peptiddel is azonosíthatók, ebből arra következtethetünk, hogy a gyenge kölcsönhatás a defoszforilált peptiddel is létrejön. A defoszforilált peptid azonban nem gátló hatású, ami arra utal, hogy a foszfortreonin jelenléte esszenciális a gátlás kialakulásához és a kölcsönhatás stabilizálásához is.

A P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ hosszú idejű defoszforilációja arra utal, hogy a peptid gátló hatását azáltal fejt ki, hogy „rossz szubsztrátja” a PP1c-nek, de a fiziológiai szubsztráttal hasonló erősséggel kötődik az enzimhez, így azzal verseng a defoszforilációs folyamatban (17. ábra). Egy közelmúltban megjelent publikáció (Filter és mtsai., 2017) ezt a mechanizmust „unfair” kompetícióként írta le. Az általunk a kísérletekben használt foszforilált miozin könnyűlánc szubsztrát aminosav sorrendje a foszforilált szerin környezetében hasonló a P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ peptidéhez, azzal a különbséggel, hogy a peptidben foszforilált oldallánc treonin.



26. ábra A P-MYPT⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹ dokkolása a PP1c szerkezetébe és a P-Thr hatása a fémion koordinálására.

Jelenleg molekuláris dokkolási szimulációkat alkalmazva (Tamás István munkája intézetünkben) keresünk választ arra, hogy milyen szerepe lehet a foszforilált oldalláncnak a defoszforiláció sebességében. Előzetes kísérletek arra utalnak (26. ábra), hogy a peptid valóban szubsztrát analóggént kötődik, viszont a peptid foszfortreonin oldallánca úgy lép kölcsönhatásba a katalitikus centrummal, hogy a foszfoészter hidrolízise szempontjából nincs olyan kedvező pozícióban, mint a szubsztrátokban található foszfoszerin. Mindezek mellett, a foszfortreonin katalitikus centrumban történő kötődése megváltoztatja a fémionok koordinációját is, növelve a koordináló aminosavak távolságát a fémiontól és ezzel valószínűleg a hidrolízis szempontjából esszenciális fémion pozíciója is változik, amely okozhatja a peptid sokkal lassúbb defoszforilációját a foszfoszerint tartalmazó szubsztráthoz képest.

Eredményeinket összegezve tehát a regulátor fehérjékből származó rövid peptidek nem igazán hatékony gátlószerei a PP1c-nek, de gátló hatásuk elemzése, valamint további szerkezeti vizsgálatok érdekes adatokkal szolgálhatnak a gátló mechanizmusra, valamint iniciálhatják hatékonyabb peptidek tervezését is.

A PP1 és PP2A szabályozása szelenoglikozidokkal

A szelenocukrokat és a hozzájuk tartozó szelenoglikozidokat a glikozidáz enzimek szerkezeti és biokémiai vizsgálatainál alkalmazzák, mivel hidrolízissel szemben ellenálló inhibitorokként viselkednek (Mehta és mtsai., 1995). A szelenoglikozidok sajátja, hogy glikozidos hidroxilcsoportjában az oxigént szelénre cserélték (Kumar és mtsai., 2012). Egyes vegyületek a lektinekhez is képesek kötődni (Andre és mtsai., 2015; Kaltner és mtsai., 2017), vagy a fertőző *Tripanoszóma*-fajok okozta fertőzéseknel a glükóz fogyasztást valamint a redox homeosztázist befolyásolják (Franco és mtsai., 2017). Annak ellenére, hogy fiziológiailag releváns ismeretekkel rendelkezünk a korábban elvégzett vizsgálatoknak köszönhetően, mégis a sejtekre gyakorolt hatásuk módja, valamint a hatások kiváltásában részt vevő interakciós partnerek még nagyrészt ismeretlenek.

Tekintettel arra, hogy a glükóz származék PGG és az ellagitanninok a PP1 és a PP2A aktivitását szabályozzák, indokoltnak tűnt, hogy az acetilált és a nem acetilált aromás szelenoglikozidok hatását is megvizsgáljuk a PP1c és a PP2Ac aktivitására. A feltételezett gátlás helyett viszont számos vizsgált szelenoglikozid aktiválta mind a PP1c mind a PP2Ac enzimet (19.-21. ábra). Az aktiválásban kitüntetett szerepe lehet a vegyületek hidrofóbicitásának, mivel csak az acetilált szelenoglikozidok voltak aktiváló hatásúak.

Eredményeink szerint a vegyületek a szubsztrát-kötő hidrofób ároktól eltérő felszínen kapcsolódnak az enzimekhez. Adataink alapján a szelenoglikozidok a PP1c-hez kapcsolódó regulátor és inhibitor fehérjékben megtalálható RVxF motívum megkötésében részt vevő felszínhez kötődnek. Molekula dokkolási eredményeink szerint a szelenoglikozidok és a motívum interakciójában fontos hidrofób aminosavak (Val és Phe) kötőfelszínének átfedése csak részleges (24. ábra). 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 csökkentik ugyan a PP1c kötődését az RVxF motívumot tartalmazó MYPT1 szabályozó fehérjéhez, de még a szelenoglikozidok „telítési” koncentrációinál is megfigyelhető PP1c-MYPT1 komplex képződés (23. ábra). Ezen adatok alapján feltételezhető akár egy PP1c-szelenoglikozid-regulátor fehérje trimer komplex képződése is, ahol a regulátor alegység és a szelenoglikozid kötődése a PP1c-hez ugyan

feltehetően gyengébb, de azért még lehetővé teszi e molekulák asszociációját. 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 (25. *ábra*).

Összefoglalva, azonosítottunk egy olyan vegyületcsaládot, amely a foszfatázok mindkét tanulmányozott típusát képes aktiválni. Mindezek ellenére a szelenoglikozidokat még nem tekinthetjük farmakológiailag releváns foszfatáz aktivátoroknak, mivel intracelluláris hatásuk meglehetősen mérsékelt, emellett citotoxikusak is mind acetilált és nem acetilált formában (25. *ábra*). Az a tény, hogy a nem acetilált és az acetilált szelenoglikozidok is csökkentették a HeLa sejtek életképességét pedig arra utal, hogy a szelenoglikozidok sejthalált indukáló hatásában a foszfatáz aktiválásnak csak legfeljebb részleges szerepe lehet, mivel az acetilált vegyületek nagyobb mértékű sejthalált idéztek elő (25. *ábra*). Mindezek ellenére a jelen munka újdonsága abban rejlik, hogy a szelenoglikozidok molekuláris templátként szolgálhatnak új foszfatáz aktivátor molekulák szintéziséhez, amelyek során a fenti hiányosságok talán kiküszöbölhetők. Ilyen célok megvalósítását az is indokolhatja, hogy a protein foszfatázokat a tumor szupresszor fehérjékhez sorolják, és a feltételezések szerint az aktivációjuk elősegíti a daganatos sejtek életképességének csökkentését (Kiss és mtsai., 2008; Ciccone és mtsai., 2015; Dedinszki és mtsai., 2015). A jövőbeni kísérleteknek kell választ adni arra is, hogy mi az interakciós háttér a PP2A aktiválásának szelenoglikozidokkal. Úgy tűnik, hogy a PP2Ac felszínén legalább két hidrofób kötőhely is hozzájárulhat aktivátor molekulák megkötéséhez, amelyek szerkezete azonban eltér a PP1c kötőfelszínétől (ld. 22. *ábra*). Mindezen tényezők mellett fontos tisztázni a vegyületeknek a sejtmembránon keresztül történő permeációjának hatékonyságát, intracelluláris koncentrációjukat és stabilitásukat.

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 sejt folyamatot 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-vel 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 sajátságait ($K_D = 0,23-1,78 \mu\text{M}$) felületi plazmon rezonancián (SPR), izoterm titrációs kalorimetrián (ITC) és mikroskálás 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 sajátságuk által sejt folyamatok szabályozásában is részt vehetnek.

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

Az acetilált szelenoglikozidokat a PP1 és a PP2A enzimek szerkezet-függő aktivátoraiként ($EC_{50} = 80-300 \mu\text{M}$) 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 kötőfelületével. 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.

Summary

Protein phosphatases and kinases are key regulatory enzymes of various cellular processes. Protein phosphatase- 1 (PP1) and -2A (PP2A) are important representatives of the phosphatase enzymes and they are believed to dephosphorylate more than 90 % of phosphoserine/threonine (P-Ser/Thr) proteins regulating a wide range of cellular processes. Our aims were to identify novel inhibitors and activators of PP1 and PP2A and to uncover the molecular mechanisms behind these inhibitory/activatory effects.

We identified ellagitannins as inhibitors of PP1 and PP2A with partial selectivity against PP1 compared to PP2A. The interaction of tellimagrandin I, the most effective inhibitor, with PP1 catalytic subunit (PP1c) was characterized by NMR saturation transfer difference (NMR-STD) spectroscopy. Quantitative features of this interaction ($K_D = 0.23\text{--}1.78\ \mu\text{M}$) were determined by surface plasmon resonance (SPR), isotherm titration calorimetry (ITC) and microscale thermophoresis (MST) based binding methods. Tellimagrandin I inhibited the phosphatase activity of HeLa cells and decreased cell viability, while mahtabin A increased the phosphorylation level of neuronal proteins and decreased the extent of exocytosis in cortical synaptosomes. These data suggest that the phosphatase inhibitory features of ellagitannins might also be involved in mediation of distinct cellular events.

A phosphopeptide (P-MYPT1⁶⁹⁰⁻⁷⁰¹), synthesized based on the phosphatase inhibitory sequence of myosin phosphatase regulatory subunit (MYPT1), inhibited ($IC_{50} = 32\ \mu\text{M}$) the activity of PP1c. This inhibition was due to the slow dephosphorylation of the P-Thr in the peptide by which an “unfair” competition with the P-Ser containing physiological substrate could occur. It is assumed that the distinct positioning of the P-Thr and P-Ser at the catalytic centre of PP1c might be responsible for the above phenomena.

Acetylated selenoglycosides were identified as activators ($EC_{50} = 80\text{--}300\ \mu\text{M}$) of both PP1 and PP2A. Competition assays with kinetic and SPR interaction analyses proved that the binding site for selenoglycosides in PP1c partially overlaps with the binding surface of RVxF motif, a sequence essential to the binding of regulatory proteins to PP1c. Selenoglycosides stimulated the phosphatase activity in HeLa cells to a small, but significant extent as well as decreased cell viability, which at least in part, may be due to phosphatase activation.

In summary, we identified ellagitannins and selenoglycosides as novel families of phosphatase inhibitor and activator molecules. These compounds might serve as templates for the development of new phosphatase mediator molecules of pharmacological significance.

Irodalomjegyzék

Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M. and Cohen, P. (1992). "The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1." Eur J Biochem **210**(3): 1023-1035.

Andre, S., Kövér, K. E., Gabius, H. J. and Szilágyi, L. (2015). "Thio- and selenoglycosides as ligands for biomedically relevant lectins: valency-activity correlations for benzene-based dithiogalactoside clusters and first assessment for (di)selenodigalactosides." Bioorg Med Chem Lett **25**(4): 931-935.

Andreeva, A. V. and Kutuzov, M. A. (2001). "PPP family of protein Ser/Thr phosphatases: two distinct branches?" Mol Biol Evol **18**(3): 448-452.

Arnaud, L., Chen, S., Liu, F., Li, B., Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2011). "Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET." FEBS Lett **585**(17): 2653-2659.

Barford, D., Das, A. K. and Egloff, M. P. (1998). "The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 133-164.

Bátori, R., Bécsi, B., Nagy, D., Kónya, Z., Hegedűs, C., Bordán, Z., Verin, A., Lontay, B. and Erdődi, F. (2017). "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.

Bollen, M. (2001). "Combinatorial control of protein phosphatase-1." Trends Biochem Sci **26**(7): 426-431.

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J. and Beullens, M. (2010). "The extended PP1 toolkit: designed to create specificity." Trends Biochem Sci **35**(8): 450-458.

Bryant, J. C., Westphal, R. S. and Wadzinski, B. E. (1999). "Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory Balph subunit." Biochem J **339** (Pt 2): 241-246.

Ceulemans, H. and Bollen, M. (2004). "Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button." Physiol Rev **84**(1): 1-39.

Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. and Hannun, Y. A. (1999). "Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid." J Biol Chem **274**(29): 20313-20317.

- Chalfant, C. E., Szulc, Z., Roddy, P., Bielawska, A. and Hannun, Y. A. (2004). "The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases." J Lipid Res **45**(3): 496-506.
- Chatterjee, J., Beullens, M., Sukackaite, R., Qian, J., Lesage, B., Hart, D. J., Bollen, M. and Kohn, M. (2012). "Development of a peptide that selectively activates protein phosphatase-1 in living cells." Angew Chem Int Ed Engl **51**(40): 10054-10059.
- Chatterjee, J. and Kohn, M. (2013). "Targeting the untargetable: recent advances in the selective chemical modulation of protein phosphatase-1 activity." Curr Opin Chem Biol **17**(3): 361-368.
- Chen, J., Martin, B. L. and Brautigan, D. L. (1992). "Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation." Science **257**(5074): 1261-1264.
- Chen, K. F., Yeh, P. Y., Hsu, C., Hsu, C. H., Lu, Y. S., Hsieh, H. P., Chen, P. J. and Cheng, A. L. (2009). "Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." J Biol Chem **284**(17): 11121-11133.
- Chen, W., Wang, Z., Jiang, C. and Ding, Y. (2013). "PP2A-Mediated Anticancer Therapy." Gastroenterol Res Pract **2013**: 675429.
- Cho, U. S. and Xu, W. (2007). "Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme." Nature **445**(7123): 53-57.
- Ciccone, M., Calin, G. A. and Perrotti, D. (2015). "From the Biology of PP2A to the PADs for Therapy of Hematologic Malignancies." Front Oncol **5**: 21.
- Cohen, P., Holmes, C. F. and Tsukitani, Y. (1990). "Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation." Trends Biochem Sci **15**(3): 98-102.
- Connor, J. H., Kleeman, T., Barik, S., Honkanen, R. E. and Shenolikar, S. (1999). "Importance of the beta12-beta13 loop in protein phosphatase-1 catalytic subunit for inhibition by toxins and mammalian protein inhibitors." J Biol Chem **274**(32): 22366-22372.
- Craig, M., Luu, H. A., McCready, T. L., Williams, D., Andersen, R. J. and Holmes, C. F. (1996). "Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases." Biochem Cell Biol **74**(4): 569-578.
- Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. and Barford, D. (1996). "Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution." EMBO J **15**(24): 6798-6809.
- Dedinszki, D., Kiss, A., Márkász, L., Márton, A., Tóth, E., Székely, L. and Erdődi, F. (2015). "Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs." Cell Signal **27**(2): 363-372.

- Du, Y., Shi, Y., Yang, J., Chen, X., Xue, M., Zhou, W. and Peng, Y. L. (2013). "A serine/threonine-protein phosphatase PP2A catalytic subunit is essential for asexual development and plant infection in *Magnaporthe oryzae*." Curr Genet **59**(1-2): 33-41.
- Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P. and Barford, D. (1995). "Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate." J Mol Biol **254**(5): 942-959.
- Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P. and Barford, D. (1997). "Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1." EMBO J **16**(8): 1876-1887.
- Erdődi, F., Tóth, B., Hirano, K., Hirano, M., Hartshorne, D. J. and Gergely, P. (1995). "Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): C1176-1184.
- Feldman, K. S., Ensel, S. M. and Minard, R. D. (1994). "Ellagitannin Chemistry. The First Total Chemical Synthesis of an Ellagitannin Natural Product, Tellimagrandin I." Journal of the American Chemical Society **116**(5): 1742-1745.
- Feldman, K. S. and Smith, R. S. (1996). "Ellagitannin Chemistry. First Total Synthesis of the 2,3- and 4,6-Coupled Ellagitannin Pedunculagin." J Org Chem **61**(8): 2606-2612.
- Filter, J. J., Williams, B. C., Eto, M., Shalloway, D. and Goldberg, M. L. (2017). "Unfair competition governs the interaction of pCPI-17 with myosin phosphatase (PP1-MYPT1)." Elife **6**.
- Franco, J., Sardi, F., Szilágyi, L., Kövér, K. E., Fehér, K. and Comini, M. A. (2017). "Diglycosyl diselenides alter redox homeostasis and glucose consumption of infective African trypanosomes." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **7**(3): 303-313.
- Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B. and Kues, W. (1998). "Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12370-12375.
- Hirschi, A., Cecchini, M., Steinhardt, R. C., Schamber, M. R., Dick, F. A. and Rubin, S. M. (2010). "An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein." Nat Struct Mol Biol **17**(9): 1051-1057.
- Honkanen, R. E. and Golden, T. (2002). "Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?" Curr Med Chem **9**(22): 2055-2075.
- Hooser, S. B., Beasley, V. R., Lovell, R. A., Carmichael, W. W. and Haschek, W. M. (1989). "Toxicity of microcystin LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from *Microcystis aeruginosa*, to rats and mice." Vet Pathol **26**(3): 246-252.

- Horváth, D., Tamás, I., Sipos, A., Darula, Z., Bécsi, B., Nagy, D., Iván, J., Erdődi, F. and Lontay, B. (2017). "Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex." PLoS One **12**(5): e0177046.
- Hu, X., Li, Z., Ding, Y., Geng, Q., Xiahou, Z., Ru, H., Dong, M. Q., Xu, X. and Li, J. (2018). "Chk1 modulates the interaction between myosin phosphatase targeting protein 1 (MYPT1) and protein phosphatase 1beta (PP1cbeta)." Cell Cycle **17**(4): 421-427.
- Ismail, T., Calcabrini, C., Diaz, A. R., Fimognari, C., Turrini, E., Catanzaro, E., Akhtar, S. and Sestili, P. (2016). "Ellagitannins in Cancer Chemoprevention and Therapy." Toxins (Basel) **8**(5).
- Janssens, V. and Goris, J. (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-439.
- Kaltner, H., Szabó, T., Fehér, K., Andre, S., Balla, S., Manning, J. C., Szilágyi, L. and Gabius, H. J. (2017). "Bivalent O-glycoside mimetics with S/disulfide/Se substitutions and aromatic core: Synthesis, molecular modeling and inhibitory activity on biomedically relevant lectins in assays of increasing physiological relevance." Bioorg Med Chem **25**(12): 3158-3170.
- Kelker, M. S., Page, R. and Peti, W. (2009). "Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors." J Mol Biol **385**(1): 11-21.
- Khanbabaee, K. and Lötzerich, K. (1998). "Synthesis of Enantiomerically Pure Unusual Ellagitannins 1,4,6-Tri-O-galloyl-2,3-(R)-hexahydroxydiphenoyl- β -D-glucopyranoside and 4,6-Di-O-galloyl-2,3-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucoside. The Proposed Chemical Structures for Cercidin A and B Must Be Revised." The Journal of Organic Chemistry **63**(24): 8723-8728.
- Kiss, A., Lontay, B., Bécsi, B., Márkász, L., Oláh, E., Gergely, P. and Erdődi, F. (2008). "Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A." Cell Signal **20**(11): 2059-2070.
- Kiss, A., Bécsi, B., Kolozsvári, B., Komáromi, I., Kövér, K. E. and Erdődi, F. (2013). "Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit protein phosphatase-1." FEBS J **280**(2): 612-626.
- Kumar, A. A., Illyes, T. Z., Kövér, K. E. and Szilágyi, L. (2012). "Convenient syntheses of 1,2-trans selenoglycosides using isoselenuronium salts as glycosylselenenyl transfer reagents." Carbohydr Res **360**: 8-18.

Leoni, L. M., Shih, H. C., Deng, L., Tuey, C., Walter, G., Carson, D. A. and Cottam, H. B. (1998). "Modulation of ceramide-activated protein phosphatase 2A activity by low molecular weight aromatic compounds." Biochem Pharmacol **55**(7): 1105-1111.

Li, M., Makkinje, A. and Damuni, Z. (1996). "The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A." J Biol Chem **271**(19): 11059-11062.

Liu, C. L., He, Y. Y., Li, X., Li, R. J., He, K. L. and Wang, L. L. (2014a). "Inhibition of serine/threonine protein phosphatase PP1 protects cardiomyocytes from tunicamycin-induced apoptosis and I/R through the upregulation of p-eIF2alpha." Int J Mol Med **33**(3): 499-506.

Liu, Q. R., Zhang, P. W., Zhen, Q., Walther, D., Wang, X. B. and Uhl, G. R. (2002). "KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine." J Biol Chem **277**(15): 13312-13320.

Liu, Q. R., Zhang, P. W., Lin, Z., Li, Q. F., Woods, A. S., Troncoso, J. and Uhl, G. R. (2004). "GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA." Biochem J **377**(Pt 1): 171-181.

Liu, Z., Ma, L., Wen, Z. S., Hu, Z., Wu, F. Q., Li, W., Liu, J. and Zhou, G. B. (2014b). "Cancerous inhibitor of PP2A is targeted by natural compound celastrol for degradation in non-small-cell lung cancer." Carcinogenesis **35**(4): 905-914.

Longin, S., Zwaenepoel, K., Louis, J. V., Dilworth, S., Goris, J. and Janssens, V. (2007). "Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit." J Biol Chem **282**(37): 26971-26980.

Lontay, B., Serfőző, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J. and Erdődi, F. (2004). "Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells." J Comp Neurol **478**(1): 72-87.

Lontay, B., Pál, B., Serfőző, Z., Kőszeghy, A., Szücs, G., Rusznák, Z. and Erdődi, F. (2012). "Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system." J Neurochem **123**(1): 84-99.

MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. and Codd, G. A. (1990). "Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants." FEBS Lett **264**(2): 187-192.

Mayer, R. E., Hendrix, P., Cron, P., Matthies, R., Stone, S. R., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Hemmings, B. A. (1991). "Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform." Biochemistry **30**(15): 3589-3597.

Mehta, S., Andrews, J. S., Svensson, B. and Pinto, B. M. (1995). "Synthesis and Enzymic Activity of Novel Glycosidase Inhibitors Containing Sulfur and Selenium." Journal of the American Chemical Society **117**(39): 9783-9790.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." J Comput Chem **30**(16): 2785-2791.

Mukhopadhyay, A., Saddoughi, S. A., Song, P., Sultan, I., Ponnusamy, S., Senkal, C. E., Snook, C. F., Arnold, H. K., Sears, R. C., Hannun, Y. A. and Ogretmen, B. (2009). "Direct interaction between the inhibitor 2 and ceramide via sphingolipid-protein binding is involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity and signaling." FASEB J **23**(3): 751-763.

Murányi, A., Erdődi, F., Ito, M., Gergely, P. and Hartshorne, D. J. (1998). "Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets." Biochem J **330 (Pt 1)**: 225-231.

Murányi, A., Derkach, D., Erdődi, F., Kiss, A., Ito, M. and Hartshorne, D. J. (2005). "Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells." FEBS Lett **579**(29): 6611-6615.

Nakano, S., Megro, S. I., Hase, T., Suzuki, T., Isemura, M., Nakamura, Y. and Ito, S. (2018). "Computational Molecular Docking and X-ray Crystallographic Studies of Catechins in New Drug Design Strategies." Molecules **23**(8).

Neviani, P., Santhanam, R., Oaks, J. J., Eiring, A. M., Notari, M., Blaser, B. W., Liu, S., Trotta, R., Muthusamy, N., Gambacorti-Passerini, C., Druker, B. J., Cortes, J., Marcucci, G., Chen, C. S., Verrills, N. M., Roy, D. C., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Byrd, J. C. and Perrotti, D. (2007). "FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia." J Clin Invest **117**(9): 2408-2421.

Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. (2006). "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks." Cell **127**(3): 635-648.

Ozaki, H., Ishihara, H., Kohama, K., Nonomura, Y., Shibata, S. and Karaki, H. (1987). "Calcium-independent phosphorylation of smooth muscle myosin light chain by okadaic acid isolated from black sponge (*Halichondria okadai*)." J Pharmacol Exp Ther **243**(3): 1167-1173.

Pato, M. D. and Kerc, E. (1985). "Purification and characterization of a smooth muscle myosin phosphatase from turkey gizzards." J Biol Chem **260**(22): 12359-12366.

Pereira, S. R., Vasconcelos, V. M. and Antunes, A. (2011). "The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins." Crit Rev Toxicol **41**(2): 83-110.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.

Rasouli, H., Farzaei, M. H., Mansouri, K., Mohammadzadeh, S. and Khodarahmi, R. (2016). "Plant Cell Cancer: May Natural Phenolic Compounds Prevent Onset and Development of Plant Cell Malignancy? A Literature Review." Molecules **21**(9).

Roberge, M., Tudan, C., Hung, S. M., Harder, K. W., Jirik, F. R. and Anderson, H. (1994). "Antitumor drug fostriecin inhibits the mitotic entry checkpoint and protein phosphatases 1 and 2A." Cancer Res **54**(23): 6115-6121.

Sah, J. F., Balasubramanian, S., Eckert, R. L. and Rorke, E. A. (2004). "Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases." J Biol Chem **279**(13): 12755-12762.

Sangodkar, J., Perl, A., Tohme, R., Kiselar, J., Kastrinsky, D. B., Zaware, N., Izadmehr, S., Mazhar, S., Wiredja, D. D., O'Connor, C. M., Hoon, D., Dhawan, N. S., Schlatzer, D., Yao, S., Leonard, D., Borczuk, A. C., Gokulrangan, G., Wang, L., Svenson, E., Farrington, C. C., Yuan, E., Avelar, R. A., Stachnik, A., Smith, B., Gidwani, V., Giannini, H. M., McQuaid, D., McClinch, K., Wang, Z., Levine, A. C., Sears, R. C., Chen, E. Y., Duan, Q., Datt, M., Haider, S., Ma'ayan, A., DiFeo, A., Sharma, N., Galsky, M. D., Brautigan, D. L., Ioannou, Y. A., Xu, W., Chance, M. R., Ohlmeyer, M. and Narla, G. (2017). "Activation of tumor suppressor protein PP2A inhibits KRAS-driven tumor growth." J Clin Invest **127**(6): 2081-2090.

Scotto-Lavino, E., Garcia-Diaz, M., Du, G. and Frohman, M. A. (2010). "Basis for the isoform-specific interaction of myosin phosphatase subunits protein phosphatase 1c beta and myosin phosphatase targeting subunit 1." J Biol Chem **285**(9): 6419-6424.

Shi, Y. (2009). "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure." Cell **139**(3): 468-484.

Shichi, D., Arimura, T., Ishikawa, T. and Kimura, A. (2010). "Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1." J Biol Chem **285**(44): 33680-33690.

Sontag, E. (2001). "Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling." Cell Signal **13**(1): 7-16.

Spjuth, O., Helmus, T., Willighagen, E. L., Kuhn, S., Eklund, M., Wagener, J., Murray-Rust, P., Steinbeck, C. and Wikberg, J. E. (2007). "Bioclipse: an open source workbench for chemo- and bioinformatics." BMC Bioinformatics **8**: 59.

Swingle, M., Ni, L. and Honkanen, R. E. (2007). "Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse." Methods Mol Biol **365**: 23-38.

Swingle, M. R., Honkanen, R. E. and Ciszak, E. M. (2004). "Structural basis for the catalytic activity of human serine/threonine protein phosphatase-5." J Biol Chem **279**(32): 33992-33999.

Takeuchi, T., Takahashi, N., Ishi, K., Kusayanagi, T., Kuramochi, K. and Sugawara, F. (2009). "Antitumor antibiotic fostriecin covalently binds to cysteine-269 residue of protein phosphatase 2A catalytic subunit in mammalian cells." Bioorg Med Chem **17**(23): 8113-8122.

Takizawa, N., Schmidt, D. J., Mabuchi, K., Villa-Moruzzi, E., Tuft, R. A. and Ikebe, M. (2003). "M20, the small subunit of PP1M, binds to microtubules." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C250-262.

Tappan, E. and Chamberlin, A. R. (2008). "Activation of protein phosphatase 1 by a small molecule designed to bind to the enzyme's regulatory site." Chem Biol **15**(2): 167-174.

Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T. and Dominguez, R. (2004). "Structural basis of protein phosphatase 1 regulation." Nature **429**(6993): 780-784.

Tóth, A., Kiss, E., Herberg, F. W., Gergely, P., Hartshorne, D. J. and Erdődi, F. (2000). "Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance." Eur J Biochem **267**(6): 1687-1697.

Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauss, S., Ropers, H. H., Schneider, R. and Schweiger, S. (2001). "MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation." Nat Genet **29**(3): 287-294.

Trott, O. and Olson, A. J. (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." J Comput Chem **31**(2): 455-461.

Tsukamoto, S., Huang, Y., Umeda, D., Yamada, S., Yamashita, S., Kumazoe, M., Kim, Y., Murata, M., Yamada, K. and Tachibana, H. (2014). "67-kDa laminin receptor-dependent protein phosphatase 2A (PP2A) activation elicits melanoma-specific antitumor activity overcoming drug resistance." J Biol Chem **289**(47): 32671-32681.

Vainio, M. J. and Johnson, M. S. (2007). "Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm." J Chem Inf Model **47**(6): 2462-2474.

Virshup, D. M. and Shenolikar, S. (2009). "From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover." Mol Cell **33**(5): 537-545.

Wakula, P., Beullens, M., Ceulemans, H., Stalmans, W. and Bollen, M. (2003). "Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1." J Biol Chem **278**(21): 18817-18823.

Wang, C. Z., Mehendale, S. R., Calway, T. and Yuan, C. S. (2011). "Botanical flavonoids on coronary heart disease." Am J Chin Med **39**(4): 661-671.

Westphal, R. S., Tavalin, S. J., Lin, J. W., Alto, N. M., Fraser, I. D., Langeberg, L. K., Sheng, M. and Scott, J. D. (1999). "Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex." Science **285**(5424): 93-96.

Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdödi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J. and Haystead, T. A. (2004). "Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides." J Biol Chem **279**(33): 34496-34504.

Xi, P., Zhou, L., Wang, M., Liu, J. P. and Cong, Y. S. (2013). "Serine/threonine-protein phosphatase 2A physically interacts with human telomerase reverse transcriptase hTERT and regulates its subcellular distribution." J Cell Biochem **114**(2): 409-417.

Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P. D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J. B. and Shi, Y. (2006). "Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins." Cell **127**(2): 341-353.

Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D. and Shi, Y. (2006). "Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme." Cell **127**(6): 1239-1251.

Yagi, K., Goto, K. and Nanjo, F. (2009). "Identification of a major polyphenol and polyphenolic composition in leaves of *Camellia irrawadiensis*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **57**(11): 1284-1288.

Yang, J., Hurley, T. D. and DePaoli-Roach, A. A. (2000). "Interaction of inhibitor-2 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. Identification of a sequence analogous to the consensus type 1 protein phosphatase-binding motif." J Biol Chem **275**(30): 22635-22644.

Yi, Z., Wang, Z., Li, H. and Liu, M. (2004). "Inhibitory effect of tellimagrandin I on chemically induced differentiation of human leukemia K562 cells." Toxicol Lett **147**(2): 109-119.

Yi, Z. C., Liu, Y. Z., Li, H. X., Yin, Y., Zhuang, F. Y., Fan, Y. B. and Wang, Z. (2006). "Tellimagrandin I enhances gap junctional communication and attenuates the tumor phenotype of human cervical carcinoma HeLa cells in vitro." Cancer Lett **242**(1): 77-87.

Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M. F., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W. W. and Fujiki, H. (1990). "Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity." J Cancer Res Clin Oncol **116**(6): 609-614.

Zhang, J., Li, L., Kim, S. H., Hagerman, A. E. and Lu, J. (2009). "Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose." Pharm Res **26**(9): 2066-2080.

Zhang, M., Yogesha, S. D., Mayfield, J. E., Gill, G. N. and Zhang, Y. (2013). "Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers." FEBS J **280**(19): 4739-4760.

Zhu, G., Liu, Y. and Shaw, S. (2005). "Protein kinase specificity. A strategic collaboration between kinase peptide specificity and substrate recruitment." Cell Cycle **4**(1): 52-56.

Tárgyszavak

Ellagitannin

Felületi Plazmon Rezonancia

HeLa sejt

Kölcsönhatás vizsgálat

Molekuladokkolás szimuláció

MYPT1

Protein foszfatáz aktivátorok

Protein foszfatáz aktivitás

Protein foszfatáz inhibitorok

Protein foszfatáz-1 (PP1)

Protein foszfatáz-2A (PP2A)

Szenoglikozid

Szinaptoszóma

Tannin

Ellagitannin

Surface Plasmon Resonance

HeLa cell

Interaction measurement

Molecular docking simulation

MYPT1

Protein phosphatase activators

Protein phosphatase activity

Protein phosphatase inhibitors

Protein phosphatase-1 (PP1)

Protein phosphatase-2A (PP2A)

Selenoglycoside

Synaptosome

Tannin

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdődi Ferencnek, hogy sok éven keresztül témavezetőmként támogatott és segített felismerni azokat a hiányosságaimat, amik korlátoztak a fejlődésemben. Tanácsaival és kreatív ötleteivel nagymértékben elősegítette a munkám előrehaladását.

Hálával és köszönettel tartozom Dr. Gergely Pálnak és Dr. Virág Lászlónak az intézetünk előző és jelenlegi igazgatójának, akik lehetővé tették, hogy munkámat az Orvosi Vegytani Intézet tagjaként a megfelelő munkafeltételek mellett végezzem el, és akik támogatásukkal bíztattak az elmúlt években.

Köszönetet mondok az Orvosi Vegytani Intézet valamennyi dolgozójának azért a segítségért, amit az évek alatt kaptam.

Köszönöm munkacsoportom minden egykori és jelenlegi tagjának (Dr. Bécsi Bálint, Tamás István, Dr. Kiss Andrea, Dr. Nagy Dénes, Dr. Bátori Róbert, Dr. Dedinszki Dóra, Dr. Horváth Dániel, Dr. Lontay Bea, Dr. Sipos Adrienn, Tóth Emese, Dr. Németh Árpádné, Docsa Andrea, Szántóné Kelemen Ágota) hogy tanácsaikkal segítettek közelebb kerülni a munkám során felmerült problémák megoldásához.

Köszönetet mondok Dr. Szilágyi Lászlónak, Dr. E. Kövér Katalinnak és Raics Máriának, hogy munkájukkal és támogatásukkal hozzájárultak közlemények létrejöttéhez.

Köszönetet mondok a Családomnak és a Barátaimnak, akik türelemmel viseltettek velem szemben az elmúlt években, és támogattak a nehezebb időkben is.

A munka kivitelezéséhez az OTKA K109249, K129104 a TÁMOP-4.2.4 A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program projektek nyújtottak támogatást. 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.

Publikációs lista



**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.**, Bátori, R. K., Dedinszki, D., Szöllősi, 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.bbadis.2018.07.013>
IF: 4.328
7. Bátori, 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* Phosphopantothenoylcysteine 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 impakt faktora: 49,276

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,829

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.08.26.



Függelék

Konferencia poszterek, előadások:

Kónya Zoltán, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc. Hexa-hidroxi-difenoil-tannin származékok eltérően gátolják a protein foszfatáz 1 és 2A enzimeket. A Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Szakosztályának III. Konferenciája, Esztergom, 2012. október 4-6. (poszter)

Kónya Zoltán, Erdődi Ferenc. Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A by hexa-hydroxy-diphenoyl-tannin derivatives, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, 2012. augusztus.30. (előadás)

Kónya Zoltán, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc. Hexa-hidroxi-difenoil-tannin származékok eltérően gátolják a protein foszfatáz 1 és 2A enzimeket. 43. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2013. május 21-24. (poszter)

Kónya Zoltán, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc. The influence of polyphenols on protein phosphatases and cell survival: structure-activity-biological effect relationships, Europhosphatase 2013: Protein Phosphatases in Health and Disease, Rehovot, Izrael, 2013. július 7-12. (poszter)

Kónya Zoltán, Erdődi Ferenc. Effect of glucopyranosyl derivatives on protein phosphatases: structure, activation/ inhibition relationship, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Magyarország, 2013. szeptember.3. (előadás)

Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc. The effect of phenyl glycosides on the activity of protein phosphatases and on the survival of HeLa cells, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Debrecen, Magyarország, 2014. augusztus.24-27. (poszter)

Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Szilágyi László, Raics Mária, Tímári István, E. Kövér Katalin, Erdődi Ferenc. Study of small molecule inhibitors and activators of protein phosphatases, Europhosphatase 2015: Phosphorylation switches and cellular homeostasis, Turku, Finnország, 2015. június 24-29. (poszter)

Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Szilágyi László, E. Kövér Katalin, Erdődi Ferenc. Selenoglycosides: novel activators of protein phosphatase-1 and -2A, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, Magyarország, 2016. augusztus 28-31. (poszter)

Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Szilágyi László, E. Kövér Katalin, Erdődi Ferenc. Aromatic derivatives of selenoglycosides: activators of protein phosphatase-1 and -2A, Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions, Párizs, Franciaország, 2017. július 23-28. (poszter)

Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Erdődi Ferenc. Interactions of protein phosphatase-1 catalytic subunit with small molecule inhibitors and activators assessed by different binding methods, Europhosphatase: From Molecular Mechanisms to System-wide Responses, Debrecen, Magyarország, 2019. június 11-16. (poszter)