

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Protein foszfatázokat szabályozó biomolekuláris  
kölcshatások meghatározása felületi  
plazmonrezonancián alapuló kötődési vizsgálatokkal**

**Bécsi Bálint**

**Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc**



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2014**

**Protein foszfatázokat szabályozó biomolekuláris kölcsönhatások meghatározása felületi plazmonrezonancián alapuló kötődési vizsgálatokkal**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti Orvostudomány tudományágban

Írta: Bécsi Bálint okleveles vegyészmérnök

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

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nyitrai Miklós, az MTA doktora

Dr. Mádi András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Élettani Intézet könyvtára  
2014. október 16. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Bacsó Zsolt, PhD

Dr. Mészáros Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Nyitrai Miklós, az MTA doktora

Dr. Bacsó Zsolt, PhD

Dr. Mádi András, PhD

Dr. Mészáros Tamás, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2014. október 16. 13:00 óra

## Bevezetés

A sejtekben lejátszódó folyamatok szabályozásában fontos szerepe van a fehérjék foszforilációjának és defoszforilációjának. A fehérje foszforiláció mértékét a foszforilációt katalizáló protein kináz és a defoszforilációt katalizáló protein foszfatáz aktivitásának aránya szabja meg. Az utóbbi évtizedekben a protein foszfatázok számos típusát azonosították, ezek közül azonban különös figyelem irányul a foszfoserin/threonin specifikus protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimekre, amelyek a sejtek foszfofehérjeinek többségét defoszforilálják. A protein foszfatázokat a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységek vagy inhibitor fehérjék szabályozzák, amelyek meghatározzák az enzim katalitikus aktivitását, illetve szubsztrátspecificitását.

### A PP1 funkciói, szerkezete és szabályozása

A protein foszfatáz-1 (PP1) holoenzim formájában minden eukarióta sejtben expresszálódik, fontos szabályozó szerepet tölt be a meiózisban és a sejtosztódásban, továbbá a sejthalálban, fehérjeszintézisben, anyagcserében, citoskeletális átrendeződésben, valamint a membránreceptorok és -csatornák szabályozásában. Emlősökben három izoformája ismert: PP1 $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  és a  $\gamma$ . Y-alakú katalitikus árkainak kereszteződésében helyezkedik el az enzimaktivitás kifejeződésében szerepet játszó aktív centrum, amely Fe<sup>2+</sup> és Zn<sup>2+</sup> ionokat koordinálva egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén elősegíti a szubsztrátmolekula foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét. A katalitikus árok három fő egységre tagolódik: C-terminális, savas és hidrofób árok, amelyek a szubsztrát kötésében játszanak fontos szerepet.

A PP1 regulátor fehérjék szerkezete igen változatos, viszont szinte mindegyik tartalmaz egy rövid szekvenciamotívumot (K/R-x1-V/I-X2-F/W,

röviden RVxF), amely biztosítja a specifikus kötődést a katalitikus alegységhez. A PP1 szabályozó alegységek két csoportba sorolhatók: célra irányító és katalitikus aktivitást gátló fehérjék. A célra irányító alegységek PP1c és szubsztrátkötő hellyel is rendelkeznek, kölcsönhatásuk során a holoenzimet az adott szubsztráthoz vagy a sejt megfelelő szubcelluláris kompartmentjéhez irányítják. Ezzel szemben a gátló fehérjék PP1c-kötő hellyel igen, míg szubsztrátkötő hellyel nem rendelkeznek, így ezek a fehérjék lehetnek az enzim szubsztrátjai (Rb, Nek2, AKAP149) vagy inhibitorai is. Az inhibitorok általában 14-32 kDa tömegű hőstabil molekulák (I1, I2, CPI-17), amelyek a PP1c-hez kötődve szabályozzák annak katalitikus aktivitását. A PP1 katalitikus alegység (PP1c) aktivitását a Thr320 oldalláncának sejtciklusfüggő foszforilációja is gátolhatja. Hasonló gátlási mechanizmus a PP2Ac tirozin foszforilációján keresztül is megvalósulhat.

A PP1 katalitikus aktivitása membránpermeábilis toxinokkal is szabályozható (okadánsav, tautomycin, mikrocisztin, kantaridin, kalikulin A), amelyek az enzim hidrofób árkába kötődve gátolják a szubsztrát kötődését és lefedhetik a katalitikus centrum egy részét is, megakadályozva ezzel a szubsztrát hidrolízisét. Ezek a toxinok a PP2A aktivitását is befolyásolják. Korábban igazolták a tanninok hatását a PP1 és PP2A enzimek aktivitására, viszont a gátlás mechanizmusa még nem ismert.

### **PP2A funkciói, szerkezete és szabályozása**

A PP2A multimer enzim, amelynek katalitikus alegysége (PP2Ac) az evolúció során nagymértékben megtartotta szerkezetét. Fontos szerepet játszik a sejtproliferációban és az apoptózisban, a sejtek motilitásában, a morfogenezisben, a sejtciklus és számos jelátviteli útvonal szabályozásában, valamint tumorszuppresszor hatása is van. Az enzim heterotrimer, amelyet a

heterodimer katalitikus (C) és A (vagy PR65) állvány alegység, valamint a B regulátor alegység épít fel. A B szabályozó alegységnek négy osztálya (és számos elnevezése) ismert, ezeket B (B55 vagy PR55), B' (B56 vagy PR61), B'' (PR48/PR72/PR130), és B''' (PR93/PR110) betűkkel vagy sokféle betűkombinációval jelölik. A B alegységek mindegyikének 2-5 izoformája létezik, így számos trimer holoenzim jöhet létre ezek variánsaként.

A PP2A szabályozása, hasonlóan a PP1-hez, egyrészt regulátor fehérjékkel való kölcsönhatásokkal valósulhat meg, másrészt különböző poszttranszlációs módosításokon keresztül is történhet, amelyben növekedési faktorok, inzulin receptor és más tirozin kinázok is részt vehetnek, gyakran az enzim inaktivációját okozva. A PP2A holoenzim aktivitását az inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjék nem befolyásolják, aktivitásához fémionok nem szükségesek, szemben a  $Mg^{2+}$ -függő PP2C-vel. A PP2A-t a foszfatáz inhibitor toxinok közül a mikrocisztin-LR (MC-LR), a kalikulin A (CLA) és az okadánsav (OA) is képes gátolni.

### **A miozin foszfatáz szerkezete és kölcsönhatása a miozin szubsztráttal**

A miozin foszfatáz (MP) holoenzimet a PP1c, a MYPT1 (Myosin Phosphatase Target subunit 1) szabályozó alegység, és egy ismeretlen funkciójú 20 kDa méretű fehérje alkotja. A MYPT1-et elsőként csirke zúza és patkány aorta könyvtárból klónozták. Azonosítottak egy hosszabb (133 kDa) és egy rövidebb (110-130 kDa) MYPT1 izoformát is. A méretbeli különbségek a középső inzert, illetve a leucin cipzár jelenlétét vagy hiányát tükrözik. A MYPT1 szerkezetének N-terminális végén található a KVKF (35-38) PP1c-kötő motívum és az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó szakasz (39-296). Elkülöníthető még a savas oldalláncokban gazdag régió (326-372),

az ionos szakaszok (719-793, 814-848), a Ser/Thr aminosavakban gazdag régió (770-793), valamint a középső inzert (517-553).

A PP1 katalitikus alegységgel kialakított kölcsönhatásában a PP1c-kötő motívum interakcióját követő MYPT1<sup>1-22</sup> szakasz kapcsolódása elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1<sup>10-296</sup>, valamint a savas MYPT1<sup>304-511</sup> régió kötődését.

A MP szubsztrát fehérjékkel való kölcsönhatásában a MYPT1 N- és C-terminális régiói is fontos szerepet játszanak. A miozin szubsztrát foszforilált könnyűlánc (P-MLC20) a MYPT1 N-terminális szakaszának ankirinszerű ismétlődéseire, míg nehézlánc a C-terminális részéhez kötődik.

### **Gyógyszerek és toxinok lipid membránnal való kölcsönhatásának vizsgálata felszíni plazmonrezonancián (SPR) alapuló kötődési technikával**

A gyógyszer-molekulák vagy toxinok kötődése a fehérjékkel vagy lipid micellákkal borított felszínhez a rezonanciajel változását okozzák, amelyből meghatározható a kölcsönhatás asszociációs-disszociációs profilja és valós időben nyomon követhető a folyamat. A felületen immobilizált lipid kettősréteg felhasználható transzmembrán fehérjék különböző kölcsönhatásainak, illetve membránpermeabilis molekulák micellákkal kialakított kapcsolatának elemzésére.

### **Fehérjék kölcsönható partnereinek azonosítása sejtlizátumból**

A SPR (Surface Plasmon Resonance) detektálási elven alapuló mérési technika lehetőséget nyújt fehérjék kölcsönható partnereinek izolálására sejtlizátumokból, majd a visszanyert mintában lévő fehérjék immunológia módszerrel és/vagy tömegspektrometriával azonosíthatók. Modern készülékek (pl. Biacore 3000) rendelkeznek egy külső egységgel, amelyben a szenzor chip

felületének több mint háromszorosa felhasználható immobilizálásra, mint az integrált mikrofluid rendszerben, és ezzel arányosan növelhető a felület kötőkapacitása is.

## Célkitűzések

A gallotanninok gátló hatását a PP1 és a PP2A enzimek aktivitására már korábban kimutatták, viszont gátlási mechanizmusuk és típuspecificitásuk nem ismert. A membránpermeábilis foszfatáz inhibitorok gátló hatásának kifejtésében a sejtmembránon való átjutás a folyamat sebesség-meghatározó lépése lehet. Az eddig alkalmazott módszerek nem szolgáltatnak adatokat az inhibitor-membrán kölcsönhatás kinetikájára vonatkozóan. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a protein foszfatáz katalitikus alegységek szabályozása különböző regulátor vagy inhibitor fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokon keresztül valósulhat meg, amely befolyásolja az adott sejt folyamat lejátszódásának irányát és sebességét is. E kölcsönhatások feltárása a jelenleg elérhető modern módszerekkel azonban még nem teljesen kidolgozott.

Mindezek alapján kutatási célkitűzéseink az alábbi kérdések tanulmányozása köré csoportosultak:

1. A polifenolok és származékaik gátló hatásának tanulmányozása a PP1 és a PP2A enzimek aktivitására.
2. Az EGCG és a PGG polifenolok kötőhelyének felderítése a PP1 enzim szerkezetében SPR módszerrel.
3. Foszfatáz inhibitorok különböző eredetű lipid micellákkal kialakított kölcsönhatásának kvantitatív jellemzése: új adatok szolgáltatása a gátlás mechanizmusának megértéséhez.
4. Új SPR detektálási elven alapuló módszer kidolgozása a protein foszfatázok kölcsönható partnereinek azonosítására sejtlyúzumból a sejtek eltérő kezelését követően.



## **Anyagok és módszerek**

### **Biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálata SPR módszerrel**

A felületi plazmonrezonancia két különböző törésmutatójú réteg határfelületén, az elektronvezetési rétegben játszódik le. A módszer lényege, hogy az egyik kölcsönható partnert immobilizáljuk a szenzor chip felületén, míg a másik partnert a felszín felett áramoltatjuk. A molekulák kötődése az immobilizált ligandumhoz megváltoztatja a felületi körülményeket, és a rezonanciajel eltolódását okozza, ami arányos a felülethez asszociált molekulák mennyiségével, tömegével. Az így kapott szenzorgram alkalmas kinetikai paraméterek, így pl. az asszociációs és disszociációs sebességi állandók ( $k_a$ ,  $k_d$ ) meghatározására, amelyből a kölcsönhatásra jellemző egyensúlyi állandók ( $K_A$ ,  $K_D$ ) számolhatóak.

Kísérleteim során CM5, SA és L1 típusú szenzor chipeket használtam. A CM5 chip karboximetil dextrán mátrixot tartalmaz, amely alkalmas amino-, tiol-, illetve aldehid-csoporton keresztül történő kovalens immobilizálásra. A streptavidinnel kovalensen módosított SA chip biotinizált fehérjék, molekulák immobilizálására, az L1 chip lipid micellák megkötésére alkalmazható.

### **A tanninok rekombináns PP1c $\delta$ -hoz való kötődésének vizsgálata SPR módszerrel**

A vizsgálat során rekombináns PP1c $\delta$ -t kovalensen, amino-csoporton keresztül immobilizáltunk CM5 szenzor chip felületére. A tanninok 70  $\mu$ l térfogatú oldatát 7 percig injektáltuk a PP1c-vel borított szenzor chip felületére, amelyet 6 perc disszociációs szakasz követett.

Kétféle kompetíciós kísérletet végeztünk a tanninok kötődési helyének felderítésére, amelyhez OA-t vagy MC-LR-t használtunk, mivel ezek PP1c-vel való kölcsönhatási mechanizmusa ismert. A szenzor chip felületén

immobilizált rPP1c $\delta$ -t 1  $\mu$ M MC-LR vagy 5  $\mu$ M OA oldatának injektálásával telítettük, majd (OA esetén ugyanezen inhibitor koncentrációk mellett) 10  $\mu$ M penta-O-galloil- $\beta$ -D-glükóz (PGG) vagy 5  $\mu$ M (-)-epigallokatekin-3-gallát (EGCG) tanninok oldatát injektáltuk a felületre.

Kidolgoztunk egy speciális PP1c immobilizálási technikát is: a biotin-MC-LR-t immobilizáltuk streptavidinnel kapcsolt SA chip felületén, amelyre rPP1c $\delta$ -t 1  $\mu$ M koncentrációban telítésig injektáltunk. A biotin-MC-LR-rPP1c kölcsönhatás elegendően erős ahhoz, hogy az immobilizált biotin-MC-LR stabilan a felületen tartsa az enzimet. Az immobilizálást követően a biotin-MC-LR-rPP1c komplexszel borított felületre a fent alkalmazott koncentrációban PGG-t és EGCG-t injektáltunk, valamint kontrollként Flag-MYPT1 1  $\mu$ M-os oldatát. A szenzorgramok kiértékelését BIAevaluation 3.1 szoftverrel végeztük.

### **Lipid micella preparálása**

Borjú agy, szív és máj teljes lipid kivonatokból micellákat készítettünk. A liofilizált teljes lipid kivonatokat első lépésben hidratáltuk (~3 mg/ml) az immobilizáláshoz használt pufferben (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4), amelyet négy egymást követő fagyasztás (-80 °C) -felolvasztás (20 °C) és vortexelés követett. Az így kialakult micellák mérete nagymértékű inhomogenitást mutatott, ezért a lipid szuszpenziót 100 nm pórusátmérőjű polikarbonát szűrőn való többszöri átpréseléssel homogenizáltuk. Ezután a lipid szuszpenziót az immobilizáló pufferben tovább hígítottuk ~1 mg/ml koncentrációra.

### **Lipid micellák immobilizálása L1 típusú szenzor chip felületére**

Az agy, szív és máj lipid kivonatokból preparált micellákat izolált felületeken 2  $\mu$ l/min áramlási sebességet alkalmazva telítésig történő

injektálással immobilizáltuk. Az lipid micellák átlagos immobilizációja  $7500 \pm 200$  rezonanciajel egységnek adódott. A referencia (lipid mentes) és a három különböző összetételű micellával borított felszínt 0,1 mg/ml BSA oldattal blokkoltuk.

### **Protein foszfatáz inhibitorok membrán-lipid micellákhoz történő asszociációjának vizsgálata SPR módszerrel**

Foszfatázgátló molekulák különböző lipidösszetételű micellákkal kialakított kölcsönhatását vizsgáltuk SPR módszerrel. A membrán-lipid micellákhoz történő asszociációs és disszociációs vizsgálatokat 20 és 37 °C-on (fiziológiás hőmérsékleten) végeztük, amelyhez L1 típusú szenzor chipet használtunk. Kinject típusú injektálási módot alkalmaztunk, amelyben 120 másodperces asszociációs és disszociációs időt állítottunk be (37 °C-on 60 s volt). Az inhibitorok oldatát egy lépésben, növekvő koncentrációban, egymás után injektáltuk a kontroll és a három különböző lipidösszetételű micellát tartalmazó felületre. Minden koncentrációsorozat után a felületeket regeneráltuk és mérés előtt friss lipid micellákkal borítottuk be. A szenzorgramok kiértékelését BIAevaluation 3.1 szoftverrel végeztük.

### **Sejtkultúrák fenntartása, kezelése foszfatáz inhibitorokkal és besugárzása UVA fényel**

Kísérleteinkhez neuroblasztóma (B50), kardiomioblaszt (H9C2), hepatokarcinóma (HepG2) és humán keratinocita (HaCaT) sejtvonalakat használtunk. A sejtek tenyésztése 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 95% levegő, valamint 80% feletti páratartalom mellett inkubátorban történt. D-MEM alapú tápfolyadékot használtunk, amely tartalmazott még 10% FBS-t, 2 mM glutamint és 100 U/ml penicillin/streptomocint és 500 U/ml antibiotikum-antimikotikumot. Foszfatáz inhibitorokkal való kezelés előtt a sejteket 16 órán

át szérumentes médiumban éhezettük. B50, H9C2 és HepG2 sejteket 60 percig inkubáltuk OA, TM, MC-LR, CA (kantaridin) és EGCG inhibitorokkal három különböző koncentrációban. Az inhibitor kezelés hatását foszfatáz aktivitás mérésekkel vizsgáltuk. A HaCaT sejteket 100 nM CLA-val kezeltük vagy 10 J/cm<sup>2</sup> UVA fényel besugároztuk Bio-Sun UV besugárzó kamrában (Vilbert Lourmat, France). A sejtek lizálását követően centrifugálás után kapott felülúszókat használtuk a foszfatáz aktivitás meghatározására és a kölcsönhatási vizsgálatokra.

### **Western blot analízis**

A sejtlyizátumokból 30 µg (foszfofehérjék esetén 50 µg) fehérjét 10%-os akrilamidot tartalmazó SDS-PAGE gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blotoltuk. A membránt 3 m/v %-os BSA oldattal blokkoltuk és az elsődleges, majd a HRP-konjugált második antitest oldatával inkubáltuk. Az immunreakciókat nagy érzékenységgű kemilumineszcencián (ECL) alapuló módszerrel detektáltuk.

### **Dot blot analízis**

A foszfatáz kölcsönhatók izolálása során nyert mintákat a készülék közvetlenül nitrocellulóz membránra cseppentette, amelyeket száradás után blokkoltunk és a Western blothoz hasonló hígításban inkubáltuk az első és második antitestek oldatával. A kapott jeleket ECL reagenssel detektáltuk.

### **Protein foszfatáz aktivitás mérése**

A foszfatáz aktivitásméréseket 30 °C-on végeztük, 1 µM <sup>32</sup>P<sub>1</sub>-vel radioaktívan jelzett miozin könnyűlánc (<sup>32</sup>P-MLC20) szubsztrátot használva. A tisztított foszfatázok esetén 10 perc, sejtlyizátumok esetén 1-2 perc inkubációs időt alkalmaztunk. A szubsztrátból felszabaduló <sup>32</sup>P<sub>i</sub>-t a fehérjék

triklór-ecetsavval történő kicsapását és centrifugálást követően a felülúszóból határoztuk meg.

### **siRNS transzfekció**

HaCaT sejtekhez panPP1 siRNS-t adva csendesítettük a PP1c-t, amelyet DharmaFECT 2 transzfekciós reagenst tartalmazó szérumentes D-MEM tápfolyadékban oldottunk. A HaCaT sejtszuspenzióhoz az siRNS-t 100 nM végkoncentrációban adtuk és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejteket sejtenyészítő edénybe szélesztettük és hozzáadtunk azonos mennyiségű 20% FBS-t tartalmazó D-MEM tápoldatot, majd 48 órára az inkubátorba tettük.

### **Mikrocisztin-LR biotinizálása**

A mikrocisztin-LR N-metildehidroalanin (MDHA) metilén-csoportjához első lépésben etánditiol (EDT) molekulát kapcsoltunk, amelyet jódacetil-LC-biotinnal reagáltattunk. A EDT-MC-LR-t C18 Sep-Pak oszlopon tisztítottuk, majd szobahőmérsékleten 90 percig sötétben inkubáltuk 6 mmol jódacetil-LC-biotin/mmol EDT-MC-LR oldattal. A biotinizált mikrocisztint fordított fázisú preparatív HPLC-n tisztítottuk. A kapott frakció biotin-MC-LR tartalmát, illetve a termék tisztaságát tömegspektrometriával (MALDI-TOF-MS) vizsgáltuk.

### **Biotin-MC-LR immobilizálása SA típusú szenzor chip felületére**

Biotin-MC-LR-t 10 mM Hepes (pH=7,4), 150 mM NaCl pufferben hígítottuk ~10  $\mu$ M koncentrációra és 2  $\mu$ l/min áramlási sebességgel injektáltuk telítésig a streptavidinnel módosított chip felületére, amely megközelítőleg 400 RU rezonanciajel változást okozott az alapvonalhoz képest.

## **A szenzor chip felületéhez kötődött komponensek visszanyerése az integrált mikrofluid rendszerből (IFC)**

Rekombináns PP1c $\delta$ -t 1  $\mu$ M koncentrációban áramoltattunk át a mikrocisztinnel módosított és a kontroll felszín felett. A telítési fázis után a felületeket mostuk, amíg a rezonanciajel stabilizálódott. A felületen kötött rPP1c-t 0,5%-os trifluoecetsav (TFA) vizes oldatával visszanyertük, amelyet a készülék közvetlenül nitrocellulóz membránra cseppentett, és dot blot technikával elemeztünk.

További kísérletekben a biotin-MC-LR-rPP1c komplexszel telített felületre a MYPT1 vad típusú (GST-MYPT1<sup>1-1004</sup>), PP1c-hez kötődő (His-MYPT1<sup>1-633</sup>) és nem kötődő (MYPT1<sup>667-1004</sup>) fragmentumait injektáltuk, amelyeket a fent leírt módon visszanyertünk és elemeztünk.

## **A szenzor chip felületéhez kötődött fehérjék visszanyerése a külső felületkezelő egységből (SPu2)**

A Biacore 3000 készülék rendelkezik egy speciális külső felületkezelő egységgel, amelynek segítségével az IFC-ben a négy cella felületéhez (4 $\times$ 1,2 mm<sup>2</sup>) viszonyítva több mint háromszoros (16 mm<sup>2</sup>) szenzor chip felszín áll rendelkezésre, ezáltal növelhető a visszanyert fehérjék mennyisége, valamint megakadályozható az IFC sejt kivonatok általi szennyeződése. Ugyanazokat a beállításokat (áramlási sebesség, injektálási és inkubációs idő) alkalmaztuk, mint az IFC-ben. Normál, PP1c-csendesített, CLA kezelt vagy UVA fényel besugárzott sejtek lizátumát injektáltuk a biotin-MC-LR-rel borított felszínre, majd a visszanyert mintákat az előzőekben leírt módon nitrocellulóz membránra cseppentve dot blottal elemeztük.

## **PP1c és PP2Ac sejten belüli lokalizációjának vizsgálata biotin-MC-LR felhasználásával**

HaCaT sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk, majd blokkoltunk. A fedőlemezeket biotin-MC-LR, majd anti-PP1c(E9) vagy anti-PP2Ac antitest oldatával inkubáltuk. Detektáláshoz Alexa 488 konjugált Streptavidin (zöld) és Alexa 594 konjugált második antitest (piros) oldatát használtuk. Végül a fedőlemezeket DNS-hez kötődő festékanyagot (DAPI) tartalmazó ProLong Gold Anitifade reagenssel a tárgylemezhez rögzítettük és Zeiss LSM 510 konfokális lézerpasztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

## Eredmények és következtetések

### **Tanninok hatása a PP1c és a PP2Ac aktivitására és a gátlási mechanizmusának vizsgálata**

Megvizsgáltuk a PGG, az EGCG, illetve az utóbbi szerkezetéhez hasonló vegyületek foszfatáz aktivitásra kifejtett hatását azzal a céllal, hogy az EGCG szerkezetében a foszfatázokkal kölcsönható régiókat azonosítsuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a PGG és az EGCG hatékony inhibitorai a protein foszfatázoknak, részlegesen szelektív gátlószerei a PP1c-nek, míg PP2Ac-re kifejtett gátló hatásuk csak kisebb mértékű. A PGG és EGCG ezen tulajdonsága lehetővé teszi a PP1 és PP2A aktivitások megkülönböztetését a tanninok bizonyos koncentrációit alkalmazva. Megállapítottuk, hogy az EGCG központi flavonol egysége és a hozzá kapcsolódó galloil-csoport jelentősen, míg a polifenolgyűrű és a fenolos hidroxil-csoportok száma csak kevésbé befolyásolják a gátlás mértékét. SPR kompetíciós kísérletekkel igazoltuk, hogy a PP1c hidrofób árkával kölcsönható klasszikus foszfatáz inhibitorok (MC-LR, OA) gátolják a PGG és az EGCG kötődését, ami közös kötőhelyre utal az enzim szerkezetében. Mindezek alapján tehát a tanninok hidrofób kölcsönhatást alakítanak ki a PP1c aktív centrumának környezetében található hidrofób árokkal. Az enzim-tannin kölcsönhatást az EGCG hidroxil-csoportjainak a PP1 katalitikus alegység aminosav oldalláncaival kialakított hidrogénkötései tovább stabilizálják. A tanninok foszfatáz aktivitásra kifejtett hatása gyengébb ( $IC_{50} \geq 0,2-0,47 \mu M$ ), mint a jól ismert foszfatázgátló toxinoké ( $IC_{50} \leq 0,1-0,05 nM$ ). Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált tanninok foszfatázgátló hatását az enzim hidrofób árkával való kölcsönhatás és ezzel a szubsztráttal való vetélkedés okozza. A toxinokkal szemben azonban a tanninok nem lépnek kölcsönhatásba sem az aktív centrummal, sem más a



szubsztrát megkötésében szerepet játszó szerkezeti résszel (pl. savas árok), ami gyengébb gátló hatásukat magyarázhatja.

A foszfatáz aktivitásmérések során kapott IC50 értékek nagymértékben eltérnek a PP1c és a PP2Ac esetén. A hidrofób kölcsönhatásban résztvevő aminosav oldalláncok a PP1c és a PP2Ac hidrofób árkanak szerkezetében nagyrészt megegyeznek, viszont a kölcsönhatás stabilizálásában szerepet játszó aminosavak, amelyek hidrogénkötést alakítanak ki az EGCG-vel, részben eltérnek. Az EGCG molekula pozíciója is különbözik a két enzim szerkezetében, azonban ez még nem indokolná az eltérő gátlási hatékonyságot. A szerkezeti és modellezési adatok alapján feltehető, hogy a PP2Ac-ben az Ala182–Gly193 hurok pozíciója különbözik a PP1c-ben az Arg187–Gly199 hurok pozíciójától. Ez a szerkezeti különbség a PP2Ac-ben csökkenti a hidrofób árok méretét, ezzel az EGCG eltérő pozíciójú kölcsönhatása nehezebben valósulhat meg. A PGG-vel hasonló modellezés a molekula nagyobb forgási szabadsági foka miatt a rendelkezésre álló programokkal nem valósítható meg, azonban a kompetíciós és NMR vizsgálatok a PP1c-vel való fő kölcsönhatást szintén a hidrofób árokkal feltételezik. E tekintetben tehát a PGG esetében tapasztalt, a PP1c és PP2Ac-re megfigyelt specificitáskülönbség hasonló szerkezeti/illeszkedési tényezőknek tulajdonítható, mint az EGCG esetében.

Összefoglalva elmondható, hogy a különböző szerkezeti felépítésű tanninok a foszfatázgátló szerek új családját alkotják, amelyek között a PGG-t és az EGCG-t a PP1c részlegesen szelektív inhibitoraként azonosítottuk. Kevésbé hatékonyak, mint a természetes toxinok, viszont nem mérgezőek és viszonylag egyszerűbb felépítésüknek köszönhetően szerkezetük kémiai módosításával feltehetően új és szelektívebb foszfatázgátlók szintézisének kiindulási molekulái lehetnek.

## **Foszfataz inhibitorok membránpermeabilis sajátságainak vizsgálata**

Foszfataz inhibitorok gátló hatásának kifejtésében fontos szerepet játszik a sejtmembránnal kialakított kölcsönhatásuk, illetve diffúziójuk a sejtbe. A membránasszociációs és -disszociációs kísérleteink elvégzéséhez SPR detektáláson alapuló mérési technikát alkalmaztunk és az inhibitorok kölcsönhatását szövetekből izolált lipidekből előállított micellákkal tanulmányoztuk. Szöveti eredetű teljes lipid kivonatokból preparált micellák és foszfatazgátló toxinok asszociációs-disszociációs tulajdonságait elsőként tanulmányoztuk. Megvizsgáltuk a klasszikus (OA, TM, MC-LR, CA, CsA) és az újonnan azonosított (EGCG) foszfataz inhibitorok kötődésének kinetikai profilját borjú agy-, szív- és májszövet eredetű lipid micellákkal történő kölcsönhatásuk során. A lipid micellák 20 °C-on stabilan immobilizálódtak a szenzor chip felületén, a foszfataz inhibitorok lipid micellákkal kialakított kölcsönhatása pedig reverzibilis volt. Az inhibitorok disszociációja az eltérő lipidösszetételű micellák felületéről nagymértékű hasonlóságot mutatott, viszont asszociációjukban szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. A fenti kölcsönhatásokat elsőként vizsgáltuk 37 °C-on, amellyel a lipid-inhibitor kölcsönhatások fiziológiai sajátságait kívántuk jellemezni. Fiziológiás hőmérsékleten az asszociációs különbségek eltűntek, az inhibitorok kötődésének koncentrációfüggése megszűnt és a disszociáció nagymértékben lelassult. Feltételezhető, hogy a hidrofób karakterű foszfataz inhibitorok (OA, TM, MC-LR) első lépésben a micellák felületéhez kötődnek, majd beépülnek a kettős réteg szerkezetébe és csak lassan disszociálnak az intracelluláris tér felé, ami valószínűleg összefüggésbe hozható az inhibitorok hatékony gátlásának kifejtéséhez szükséges hosszú inkubációs idővel. A részlegesen hidrofíl karakterű inhibitorok (CA, EGCG) nem képesek megfelelő mértékben beépülni a membránba, ami csökkenti permeációs képességüket. Az SPR

kísérletek eredményeképp kapott szenzorgramok azt sugallják, hogy 37 °C-on a hidrofób karakterű és nagyobb molekulatömegű inhibitorok (OA, TM, MC-LR) az asszociációs szakaszban beépülnek a „fluidabbá” vált micella szerkezetébe, visszatartódnak és csak lassan képesek disszociálni az injektálást követő mosási fázisban. Ezzel szemben a kisebb molekulatömegű gátlószerke (CA, EGCG) vagy egyáltalán nem vagy akadály nélkül mozognak a lipid membránon és a mosási fázisban teljes mértékben disszociálnak. Az *in vitro* membránasszociációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a különböző szöveti eredetű micellák kötőkapacitása eltérő, a foszfatáz inhibitorok legkisebb mértékben az agyból kivont lipidekhez asszociáltak, legnagyobb mértékben a májlipidekhez kötődtek. Az *in vivo* kísérletek szerint a különböző sejtvonalak esetén a foszfatáz inhibitorokkal való kezelés a B50 sejteken csökkentette legkevésbé a foszfatáz aktivitást, ami jó egyezést mutat az *in vitro* kötődési kísérletek eredményével. Mindkét kísérlet alapján feltételezhető, hogy a lipid membránok telítődése már alacsony inhibitor koncentráció esetén bekövetkezik, amelynek drasztikus növelése is csak kismértékű változást okozott a rezonanciajelben vagy a gátlás mértékében. Ez azt sugallja, hogy a gátlási folyamatban a sebesség-meghatározó lépés az inhibitorok diffúziója az intracelluláris térbe, amit a membránok inhibitor-kötő kapacitása is befolyásol.

Az aktivitásmérések és a látszólagos disszociációs egyensúlyi állandók között nem találtunk összefüggést. A számított látszólagos disszociációs állandó ( $K_{D(app)}$ ) értéke OA esetén nagy affinitást mutatott a lipidekkel, ezzel szemben csak kismértékű aktivitáscsökkenést okozott még a legnagyobb koncentrációban is. A TM-re kapott  $K_{D(app)}$  értéke viszonylag magas, foszfatáz aktivitásra kifejtett hatása viszont alacsony koncentráció esetén is jelentős. A CA nagy affinitással kötődik a lipid micellákhoz, míg foszfatáz aktivitást gátló hatása nem szignifikáns vagy csak nagyon

kismértékű. Ezen megállapítások azt sugallják, hogy az inhibitorok gátló hatásának kifejtésében nemcsak a toxinok lipidekkel való kölcsönhatásának erőssége az egyetlen befolyásoló tényező, hanem más faktorok is szerepet játszanak. A MC-LR az epesav transzporterén keresztül képes bejutni a májsejtekbe. Az általunk vizsgált HepG2 sejtvonal nem tartalmazza az említett transzportert, így nem is meglepő, hogy a MC-LR gátlása mindhárom sejtvonalon hasonló. Méréseink alapján megállapítható és korábbi kísérletekkel is összhangban van, hogy a MC-LR magasabb koncentrációban az epesav transzporter jelenléte nélkül is képes a sejtekbe diffundálni és foszfatázgátló hatást kifejteni.

Eredményeink arra utalnak, hogy az SPR detektáláson alapuló mérési technika alkalmas foszfatáz inhibitorok komplex összetételű lipid micellákkal kialakított kölcsönhatásának jellemzésére. Az inhibitorok kötődését nagymértékben befolyásolja a micellák lipidösszetétele. A B50, H9C2 és HepG2 sejtvonalakon végzett foszfatáz aktivitásmérések is azt igazolják, hogy az alkalmazott foszfatázgátló szerek hatásának kifejlődése a sejtek típusától is függ, amiben feltehetően a membránok eltérő lipidösszetétele tükröződik.

### **Protein foszfatázok kölcsönható partnereinek izolálása és azonosítása HaCaT sejtek lizátumából**

A sejtfolyamatok foszforilációval történő szabályozásában fontos szerepe van a protein foszfatáz katalitikus alegység regulátor és inhibitor fehérjékkel, valamint szubsztrát fehérjékkel kialakított kölcsönhatásának. A SPR alapú technika elvileg alkalmas fehérjekomplexek izolálására kis mennyiségű sejtlizátumból, amely a visszanyert minta tömegspektrometriás analízisével kiegészítve sokkal gyorsabban szolgáltat eredményeket a lehetséges fehérje interakciókra, mint a konvencionális módszerek. Az

izoláláshoz szükséges egy olyan, a szenzor chip felületén immobilizálható „befogó” molekula, amely megfelelően stabil komplexet képez a célfehérjével, amit alapos mosási lépés után kölcsönható partnereivel együtt visszanyerhetünk és elemezhetünk.

Az általunk kidolgozott módszer segítségével a mikrocisztin-érzékeny protein foszfatázok (PP1, PP2A, PP2B, PP4-7) és kölcsönható fehérjéinek izolálása gyors és minimális mintamennyiséget igényel. A MC-LR-t biotiniláltuk és streptavidinnel kovalensen módosított szenzor chip felületére immobilizáltuk. A MC-LR-biotin-streptavidin kölcsönhatás megfelelően erős ( $K_D \sim 10^{-15}$ ) ahhoz, hogy a felületen tartsa a sejtlizátumból kikötött foszfatázokat és kölcsönható partnereit. A visszanyerési folyamat során alkalmazott eljárás a MC-LR-biotin-streptavidin kölcsönhatást nem befolyásolja, így a kialakított felület a foszfatázok és kölcsönható partnereik izolálására többször is felhasználható. A módszert első lépésben rekombináns PP1c $\delta$ -val, annak MYPT1 regulátor alegységével, PP1c-hez kötődő és nem kötődő MYPT1 fragmentumaival teszteltük. Megállapítottuk, hogy a biotin-MC-LR képes a rPP1c-t stabilan immobilizálni, az így kialakult komplex köti a teljes hosszúságú regulátor alegységet és annak PP1c-vel kölcsönható N-terminális fragmentumait, míg C-terminális szakaszával nem lép kölcsönhatásba.

Normál és PP1c-csendesített, valamint CLA kezelt keratinocita sejtek lizátumából visszanyert mintákban mind a foszfatázok, mind pedig a kölcsönható fehérjék mennyiségi, valamint a fehérjék foszforilációs változása is detektálható. A dot blot analízis általában nem szolgáltat kvantitatív mérési eredményeket, viszont a bemutatott kísérletekkel igazoltuk, hogy az elemzés fókuszában szereplő fehérjéknek a visszanyert mintákban lévő koncentrációja tükrözi sejtbeli mennyiségük változását. A módszerrel vizsgáltuk kezeletlen és

UVA-fénnyel besugárzott HaCaT sejtekben a PP1c, a PP2Ac, valamint ezek regulátor és inhibitor fehérjéinek mennyiségi változását. Eredményeink szerint a visszanyert mintákban a vizsgált foszfatáz katalitikus alegységek és regulátor fehérjék mennyisége is csökkent UVA besugárzás hatására. Kísérleteinket foszfatáz aktivitásmérések is alátámasztották, miszerint az UVA kezelés közel 40%-kal csökkentette keratinocita sejtekben a foszfatázok aktivitását. Ezzel szemben a Western blot vizsgálat nem mutatott változást a sejt-lizátumban lévő fehérjék mennyiségében. Feltételezhető, hogy UVA besugárzás hatására a sejtekben keletkezett reaktív oxigéngyökök oxidálják a fémionokat és/vagy a cisztein oldallácokat a PP1c és PP2Ac-ben, ami a foszfatázok szerkezetének megváltozását és aktivitásának csökkenését okozza, módosítva ezzel az inhibitorokhoz (pl. MC-LR) és a regulátor fehérjékhez való kötődésüket is.

A visszanyert minták tömegspektrometriás analízise nem hozott eredményt, mivel az immobilizált biotin-MC-LR nemcsak a PP1c-t és a PP2Ac-t, hanem számos mikrocisztinnel kölcsönható protein foszfatázt is képes a felületen kötni, így a biotin-MC-LR kötőkapacitása megoszlik ezen enzimek között. Tovább csökkenti az egyes foszfatázokkal kölcsönható fehérjék mennyiségét a visszanyert mintában az, hogy a kialakult nagyméretű komplexek lefednek számos potenciális MC-LR molekulát a felületen, így sztérikusan gátolják a fehérjék kötődését az immobilizált befogó molekulákhoz, azaz a kötőkapacitás csak részben kihasznál.

Eredményeink arra utalnak, hogy az általunk kidolgozott módszer alkalmas a PP1c és a PP2Ac megváltozott asszociációs képességének detektálására a chip felületén immobilizált MC-LR inhibitorhoz vagy kölcsönható fehérjékhez a sejtek fiziológiás vagy patológiás elváltozásait követően. A módszer szintén felhasználható a PP1c és PP2Ac, illetve

regulátor fehérjék poszttranszlációs módosításainak vizsgálatára, valamint előzetes eredményeket szolgáltat a foszfatáz komplexek összetételéről. A bemutatott technika ismert foszfatáz kölcsönható fehérjék azonosítására korlátozódik, amelyek detektálásához specifikus antitest szükséges. A módszer további fejlesztése során arra fókuszálunk, hogy mivel a biotin-MC-LR felszín a kísérlet során nem károsodik, így az MS-analízishez szükséges nagyobb mennyiségű mintát a visszanyerési folyamat többszöri megismétlésével előállítsuk.

## Az új eredmények összefoglalása

1. Kimutattuk, hogy a tanninok közül az EGCG és a PGG hatékonyan gátolják a PP1 és PP2A enzimek aktivitását és a PP1-részlegesen szelektív gátlószereinek tekinthetők. Ezek az inhibitorok gátló hatásukat, SPR kompetíciós kísérletek alapján, a PP1 katalitikus centrumának hidrofób árkába kötődve fejtik ki. Eredményeink arra utalnak, hogy a tanninok a foszfatázgátló molekulák új családjának tekinthetők és kémiai módosításukkal hatékony, kevésbé toxikus és szelektív gátlószerek fejleszthetők.
2. Az inhibitorok membránasszociációja fiziológias hőmérsékleten gyors, mértéke függ a lipidösszetételtől, disszociációjuk viszont lassú, feltehetően az inhibitorok lipid micellákban történő interkalációja miatt. Megállapítható, hogy a foszfatázgátló toxinok membrán lipidekkel való kölcsönhatási sajátágaik befolyásolják az inhibitorok különböző eredetű sejtekre kifejtett gátló hatását.
3. A foszfatázgátló mikrocisztin-LR (MC-LR) biotinilált formáját, mint „befogó” molekulát alkalmaztuk PP1c és PP2Ac, valamint ezek kölcsönható fehérjéinek izolálására streptavidinnel kapcsolt szenzor chip felületén HaCaT sejtek lizátumából SPR módszerrel. A visszanyert fehérjék immunológiai elemzésével megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas a PP1c és a PP2Ac, valamint kötődő fehérjéik és azok foszforilációs állapota megváltozásának detektálására kontroll, foszfatázgátlóval kezelt vagy UVA fényvel besugárzott HaCaT sejtek lizátumából.





Iktatószám: DEENKÉTK/180/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Bécsi Bálint  
Neptun kód: P8Q2RR  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10034521

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

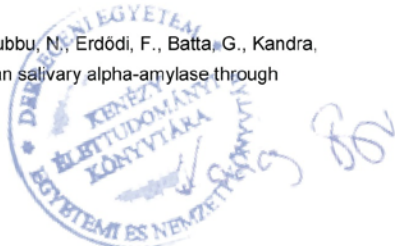
1. **Bécsi, B.**, Kiss, A., Erdődi, F.: Interaction of protein phosphatase inhibitors with membrane lipids assessed by surface plasmon resonance based binding technique.  
*Chem. Phys. Lipids. 183C*, 68-76, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.05.009>  
IF:2.147 (2012)
2. **Bécsi, B.**, Dedinszki, D., Gyémánt, G., Máthé, C., Vasas, G., Lontay, B., Erdődi, F.: Identification of protein phosphatase interacting proteins from normal and UVA-irradiated HaCaT cell lysates by surface plasmon resonance based binding technique using biotin-microcystin-LR as phosphatase capturing molecule.  
*J. Photochem. Photobiol. B. 138C*, 240-248, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.004>  
IF:3.11 (2012)
3. Kiss, A., **Bécsi, B.**, Kolozsvári, B., Komáromi, I., Kövér, K.E., Erdődi, F.: Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose inhibit protein phosphatase-1.  
*FEBS J. 280 (2)*, 612-626, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08498.x>  
IF:4.25 (2012)





### További Közlemények

4. Kolozsvári, B., Bakó, É., **Bécsi, B.**, Kiss, A., Czikora, Á., Tóth, A., Vámosi, G., Gergely, P., Erdődi, F.: Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase.  
*Cardiovasc. Res.* 96 (3), 494-503, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvs255>  
IF:5.94
5. Czikora, I., Kim, K., Kása, A., **Bécsi, B.**, Verin, A., Gergely, P., Erdődi, F., Csontos, C.: Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1.  
*Biochimie.* 93 (7), 1139-1145, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.011>  
IF:3.022
6. Radnai, L., Rapali, P., Hódi, Z., Süveges, D., Molnár, T., Kiss, B., **Bécsi, B.**, Erdődi, F., Buday, L., Kardos, J., Kovács, M., Nyitrai, L.: Affinity, avidity, and kinetics of target sequence binding to LC8 dynein light chain isoforms.  
*J. Biol. Chem.* 285 (49), 38649-38657, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.165894>  
IF:5.328
7. Tóth, B., Garabuczi, É., Sarang, Z., Vereb, G., Vámosi, G., Aeschlimann, D., Blaskó, B., **Bécsi, B.**, Erdődi, F., Lacy-Hulbert, A., Zhang, A., Falsca, L., Birge, R.B., Balajthy, Z., Melino, G., Fésüs, L., Szondy, Z.: Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells.  
*J. Immunol.* 182 (4), 2084-2092, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803444>  
IF:5.646
8. Gyémánt, G., Zajác, Á., **Bécsi, B.**, Ragunath, C., Ramasubbu, N., Erdődi, F., Batta, G., Kandra, L.: Evidence for pentagalloyl glucose binding to human salivary alpha-amylase through aromatic amino acid residues.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (2), 291-296, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.012>  
IF:2.48





**DEBRECENI EGYETEM**  
**EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
**PUBLIKÁCIÓK**



9. Kiss, A., Lontay, B., **Bécsi, B.**, Márkász, L., Oláh, É., Gergely, P., Erdődi, F.: 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, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.07.018>  
IF:4.305

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36.228**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9.507**

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, 2014.07.24

