

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Protein foszfatázokat szabályozó biomolekuláris kölsönhatások meghatározása felületi plazmonrezonancián alapuló kötődési vizsgálatokkal

Bécsi Bálint

Témavezető: Dr. Erdődi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	5
Irodalmi áttekintés	7
Szerin/treonin specifikus protein foszfatázok csoportosítása	7
A PP1 funkciója és szerkezete	8
A PP1 szerkezete és szabályozása	9
A PP2A funkciója és szerkezete	10
A PP2A szabályozása	11
Protein foszfatázok kölcsönhatásainak vizsgálata Biacore kötődési technikával	11
A MYPT1 szerkezete és rokon fehérjéi	12
MYPT1 kölcsönhatása a PP1 katalitikus alegységgel és a miozin szubsztráttal	14
PP1c és PP2Ac gátlása természetes toxinokkal	14
Tanninok hatása a protein foszfatázok aktivitására	16
Foszfatáz inhibitorok hatásmechanizmusa	18
Gyógyszerek és toxinok membránasszociációs és -disszociációs vizsgálatának modellezése lipid micellákhoz való kötődéssel	18
Fehérjék kölcsönható partnereinek azonosítása sejtlyázátumból	19
Célkitűzések	20
Anyagok és módszerek	21
Anyagok	21
Antitestek	21
Fehérjék és peptidek	22
Biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálata SPR detektáláson alapuló módszerrel	22
A tanninok rPP1c δ -hoz való kötődésének vizsgálata SPR módszerrel	24
Lipid micellák preparálása	25
Lipid micellák immobilizálása L1 típusú szenzor chip felületére	27
Protein foszfatáz inhibitorok membránasszociációs vizsgálata SPR módszerrel	27
Sejtkultúrák fenntartása, kezelése foszfatáz inhibitorokkal és besugárzása UVA fénnel ..	28
Western blot analízis	28
Dot blot analízis	29
Protein foszfatáz aktivitás mérése	29
siRNS transzfekció	30
Mikrocisztin-LR biotinilálása	30
Biotin-MC-LR immobilizálása SA típusú szenzor chip felületére	32
A kötődő komponensek visszanyerése a szenzor chip felületéről az integrált mikrofuid rendszerben (IFC)	32

A chiphez kötődő fehérjék visszanyerése a külső felületkezelő egységben (Surface prep unit 2).....	33
PP1c és PP2Ac sejten belüli lokalizációjának vizsgálata biotin-MC-LR felhasználásával ..	34
Eredmények	35
Polifenolok PP1c és PP2Ac gátló hatásának vizsgálata	35
<i>Tanninok hatása a tisztított PP1c és PP2Ac aktivitására</i>	35
<i>PP1cδ kölcsönhatásának vizsgálata PGG és EGCG tanninokkal Biacore kötődési technikával</i>	37
<i>PGG és EGCG foszfatázgátló mechanizmusának vizsgálata</i>	38
Foszfatáz inhibitorok gátló mechanizmusának vizsgálata.....	41
<i>Foszfatáz inhibitorok különböző szöveti eredetű membránokkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálata SPR technikával</i>	41
<i>PP1 és PP2A eloszlása B50, H9C2 és HepG2 sejtekben</i>	46
<i>Inhibitorok hatása a B50, H9C2 és HepG2 sejtek foszfatáz aktivitására</i>	47
Protein foszfatázok kölcsönható fehérjeinek izolálása sejt-lizátumból	49
<i>Mikrocisztin-LR biotinilálása, tisztítása és ellenőrzése</i>	49
<i>A biotinilált MC-LR immobilizálása és tesztelése a streptavidinnel konjugált (SA) szenzor chip felületén</i>	50
<i>PP1c és PP2Ac, valamint kölcsönható fehérjeinek azonosítása kontroll és kezelt HaCaT sejtek lizátumában</i>	52
<i>PP1c és PP2Ac kölcsönható partnereinek izolálása és azonosítása normál és UVA besugárzott HaCaT sejtek lizátumából</i>	54
<i>A biotin-MC-LR alkalmazása a protein foszfatázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára</i>	56
Megbeszélés	57
Tanninok hatása a PP1c és PP2Ac aktivitására és a gátlási mechanizmusának vizsgálata ..	57
Foszfatáz inhibitorok membránpermeábilis sajátságainak vizsgálata	59
Protein foszfatázok kölcsönható partnereinek izolálása és azonosítása HaCaT sejt-lizátumból	61
Összefoglalás	64
Summary	65
Irodalomjegyzék	66
Tárgyszavak	77
Köszönetnyilvánítás	78
Publikációs lista	79
Függelék	82

Rövidítések jegyzéke

[γ-³²P]ATP	radioaktívan jelzett adenzin-5'-trifoszfát
CLA	kalikulin A
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
CsA	ciklosporin A
DMSO	dimetilszulfoxid
DTT	ditiotritol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EGCG	(-)-epigallokatekin-3-gallát
FBS	marhaszérum
GST	glutathion-S-transzferáz
I1	inhibitor-1
I2	inhibitor-2
IFC	integrált mikrofluid rendszer
MC-LR	mikrocisztin-LR
MYPT1	miozin foszfátáz regulátor alegység 1
NHS	N-hidroxiszukcinimid
OA	okadánsav
PGG	penta-O-galloil- β -D-glükóz
PP1	protein foszfátáz-1
PP2A	protein foszfátáz-2A
PP4-6	protein foszfátáz-4-6
Rb	retinoblasztóma fehérje
Ser	szerin
SPR	felületi plazmonrezonancia
SPU2	külső felületkezelő egység 2
TCA	triklórecetsav
TFA	trifluorecetsav
Thr	treonin
TIMAP	TGF- β által szabályozott membránhoz kötődő fehérje
TM	tautomycin
Tyr	tirozin

Bevezetés

A sejtekben lejátszódó folyamatok szabályozásában fontos szerepe van a fehérjék foszforilációjának és defoszforilációjának. A fehérjék közel egyharmada tartalmaz kovalensen kötött foszfátcsoportot (Hunter és mtsai., 1995), amelyek beépítéséért a protein kinázok, kihalásáért a protein foszfatázok a felelősek. A kinázok az ATP terminális foszfátcsoportját építik be a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncába (Cohen és mtsai., 1989), amely befolyásolhatja a fehérje sejtben belüli funkcióit. A protein foszfatázok a folyamat visszafordításáért felelősek, amelyek a beépült foszfátcsoportok hidrolízisét katalizálják.

A protein foszfatáz katalitikus alegységek jóval kisebb számban fordulnak elő, mint a protein kinázok, azonban kis számukat a hozzájuk kapcsolódó regulátor alegységekkel kialakuló sokféle holoenzim formák ellensúlyozzák, amelyek meghatározzák az enzim szubsztrátspecifitását, illetve katalitikus aktivitását. A szabályozó alegységek a katalitikus alegységhez kapcsolódva a holoenzimet a szubsztráthoz irányítják. A protein foszfatázok szabályozásában fontos szerepe van az inhibitor fehérjéknek és a természetes eredetű toxinoknak is. Az inhibitor fehérjék a sejtben belül szabályozzák az enzim katalitikus aktivitását, ezzel szemben a toxinok a sejtmembránon áthatolva befolyásolhatják az enzim működését, amely gátlási folyamat több tényezőből épül fel. A toxinok gátló hatásában fontos szerepe van a toxin sejtmembránhoz történő asszociációjának és disszociációjának, valamint a membránon való átjutásának és az enzimmel kialakított kölcsönhatásának. Az inhibitor fehérjék és természetes toxinok hatásában közös, hogy mindkettő a foszfatázok katalitikus centrumának közelébe kötődve, a szubsztrátkötő zseb részleges elfoglalásával gátolja az enzimek aktivitását és kölcsönhatását a szubsztráttal.

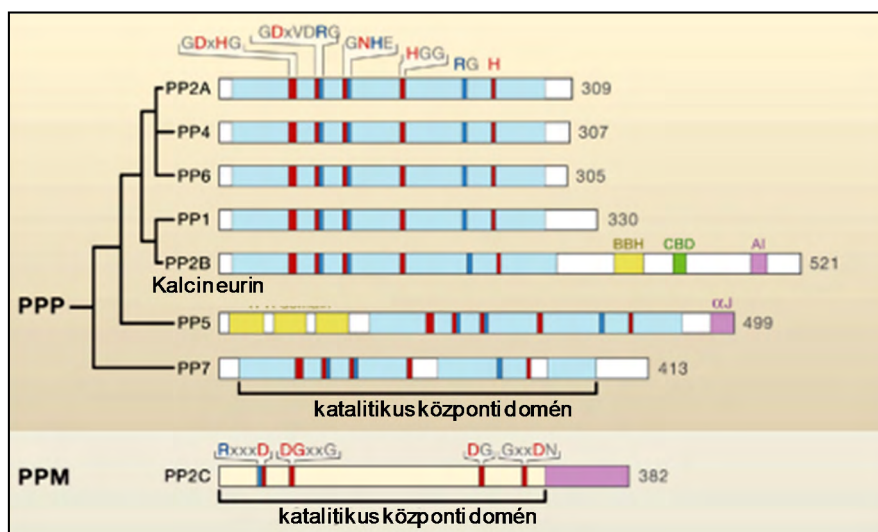
Munkám során célul tűztem ki a protein foszfatáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) katalitikus alegységek inhibitorainak lipid micellákkal való kölcsönhatási mechanizmusának vizsgálatát felületi plazmonrezonancia (SPR) alapú kötődési technika alkalmazásával. Ezen molekulák gátló hatásának kifejtésében igen fontos lépés a sejtmembránon való átjutás, ami feltételezhetően függ a membrán lipidösszetételétől. Megvizsgáltuk különböző polifenolok foszfatázgátló hatását is, valamint SPR módszerrel kompetíciós kísérletben feltártuk a PGG (penta-O-galloil- β -D-glükóz) és az EGCG ((-)-epigallokatekin-3-gallát) kötőhelyét a PP1 katalitikus alegység szerkezetében. Megállapítottuk, hogy a PGG és az EGCG az ismert foszfatáz inhibitorokhoz hasonlóan a katalitikus centrum hidrofób árkába kötődik. Kidolgoztunk egy új, felületi plazmonrezonancián (SPR) alapuló PP1 katalitikus alegység (PP1c) immobilizálási technikát, amelynek során a mikrocisztin-LR toxint (MC-LR)

biotiniláltuk és streptavidinnel kovalensen módosított szenzor chip felületére immobilizáltuk. A streptavidin a biotin-MC-LR-rel megfelelően erős komplexet ($K_D \sim 10^{-15}$) képez ahhoz, hogy a felület felett áramoltatott PP1c-t reverzibilisen kötve további PP1 kölcsönhatási kísérletekre legyen alkalmas. Ezzel a technikával kidolgoztunk egy új módszert a foszfátáz katalitikus alegységek (PP1c és PP2Ac) és kölcsönható partnereik izolálására sejtlizátumból, majd az így nyert mintákból a foszfátázokat és kölcsönható partnereiket immunológiai módszerrel azonosítottuk.

Irodalmi áttekintés

Szerin/treonin specifikus protein foszfatázok csoportosítása

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok szerkezete, szekvenciája és katalitikus mechanizmusa alapján két csoportba sorolhatóak: foszfoprotein foszfatázok (PPP) és fémionfüggő protein foszfatázok (PPM) (Barford és mtsai., 1996; Cohen és mtsai., 1997; Gallego és mtsai., 2005) (1. ábra). A PPP családba tartozó enzimekre jellemző, hogy a katalitikus alegységek különböző szabályozó (regulátor) alegységekkel kölcsönhatásba lépve holoenzimet képeznek. A regulátor alegységek a katalitikus alegységek „célra irányításáért” („targeting”), az enzim aktivitásának és szubsztrátspecifitásának szabályozásáért felelősek. Ide tartoznak a katalitikus centrumban Zn^{2+}/Fe^{2+} ionokat tartalmazó PP1, PP2A, PP2B, valamint az új típusú protein foszfatázok: PP4, PP5, PP6, PP7. A PPM családba tartozik a Mn^{2+}/Mg^{2+} -függő PP2C, amelyre jellemző, hogy a szerkezetében található regulátor domén felelős a szubsztrátspecifitásért (Shi és mtsai., 2009) és aktivitásához a katalitikus centrumban elhelyezkedő fémionokon kívül extra fémion (Mn^{2+}/Mg^{2+}) kötődése is szükséges. Mindkét csoportban közös, hogy egy vízmolekula fémionokkal történő aktivációja indítja be a defoszforilációs folyamatot.



1. ábra Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportosítása
(módosított ábra, Shi, 2009)

Az ábrán a PPP (foszfoprotein foszfatázok) és a PPM (fémionfüggő protein foszfatázok) családba tartozó Ser/Thr specifikus protein foszfatázok típusai láthatóak. A kék és a piros színnel jelölt szekvenciák a foszfátkötésben és a fémionok koordinációjában vesznek részt; CBD: Ca^{2+} kalmodulinkötő motívum; BBH: CNB (kalcineurin B alegység)-kötő hélix. A PPP családra jellemző három konzervált régió (GDxHG, GDxVDRG, GNHE) az ábra felső részén látható.

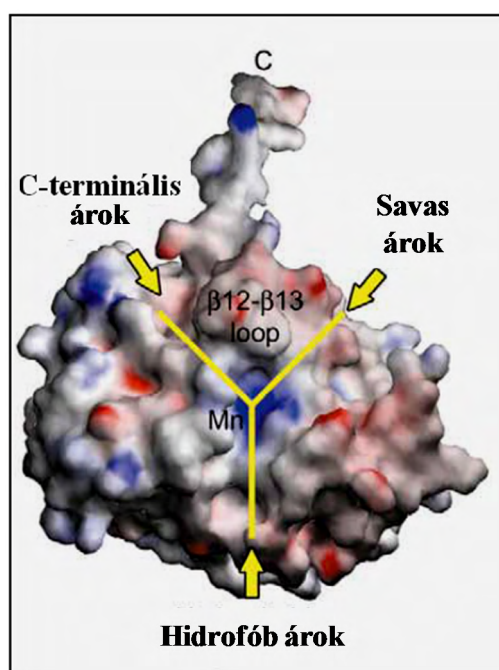
Egy másik csoportosítási és elnevezési elv szerint a sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló Ser/Thr specifikus foszfatázok szubsztrátspecifitásuk és inhibitor

fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján PP1 és PP2 csoportba sorolhatóak. A PP1 enzimek aktivitását az inhibitor-1 (I1) és inhibitor-2 (I2) fehérjék és a heparin gátolják, a PP2 csoportba tartozókat pedig nem befolyásolják (Ingebritsen és mtsai., 1983). A PP2 csoportba tartozókat tovább osztályozhatjuk fémionfüggésük alapján. A PP2A aktivitása független az extra fémionok jelenlététől, míg a PP2C Mg^{2+} -függő enzim.

Vizsgálataink középpontjában a PP1 és PP2A enzimek szerepelnek, amelyek az összes foszfo-Ser/Thr oldalláncot tartalmazó fehérje több mint 90%-ának defoszforilációjáért felelősek (Fernandez és mtsai., 2002; Brautigan és mtsai., 2012).

A PP1 funkciója és szerkezete

A PP1 katalitikus alegység (PP1c) minden eukarióta sejtben expresszálódik, fontos szabályozó szerepet tölt be a meiózisban és a sejtsztódásban, továbbá a sejthalálban, a fehérjeszintézisben, az anyagcserében, a citoszkeletális átrendeződésben, valamint a membránreceptorok és -csatornák szabályozásában (Cohen és mtsai., 2002; Ceulemans és mtsai., 2004).



2. ábra A PP1 katalitikus alegység szerkezete
(módosított ábra, Gallego és Virshup, 2005)

A PP1c katalitikus centruma a C-terminális, a savas és a hidrofób árok metszéspontjában helyezkedik el, amelyek fontos szerepet játszanak a szubsztát kötésében és az enzim gátlásában. A $\beta 12$ - $\beta 13$ hurok a savas és C-terminális árokat választja el. A piros és kék színek a pozitív és negatív töltésű részeket jelölik a szerkezetben.

Emlősökben a PP1c három izoformája ismert: PP1c α , PP1c β/δ és a PP1c γ . A PP1c γ két alternatív hasítással keletkező izoformája a PP1c γ_1 és a PP1c γ_2 . A PP1c az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje, különböző izoformái 90% feletti szekvencia-homológiát mutatnak.

A PP1 szerkezete N- és C-terminális régiókra osztható. Az N-terminális régió kompakt szerkezetének Y-alakú katalitikus árkainak kereszteződésében helyezkedik el az enzimaktivitás szabályozásában szerepet játszó aktív centrum (2. ábra). Az aktív centrum Fe²⁺ és Zn²⁺ ionokat koordinál, amelyek egy szerkezeti vízmolekula aktiválása révén elősegítik a szubsztrátmolekula foszfo-Ser/Thr oldalláncának hidrolízisét. A katalitikus árok három fő egységre tagolódik: a C-terminális, savas- és hidrofób árok, amelyek a szubsztrát kötésében játszanak fontos szerepet.

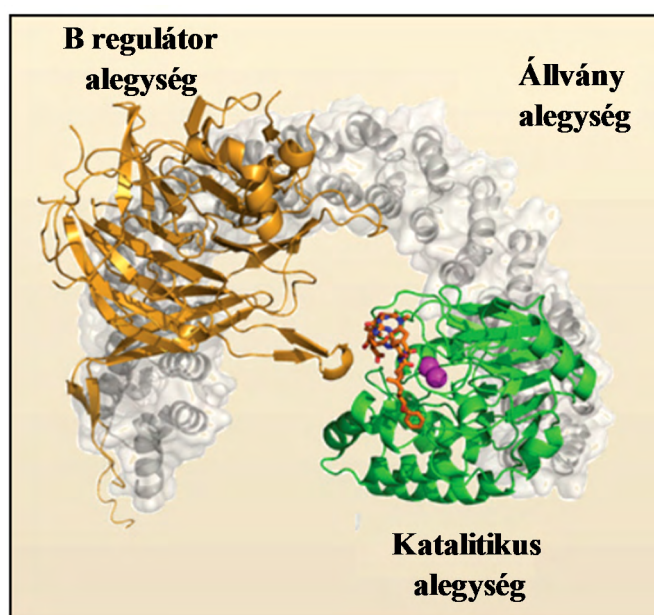
A PP1 szerkezete és szabályozása

A PP1c számos fehérje defoszforilációját képes katalizálni, specificitását a hozzá kapcsolódó regulátor fehérje határozza meg, amelyek száma több mint 200-ra tehető (Hendrickx és mtsai., 2009; Bollen és mtsai., 2010; Choy és mtsai., 2012). A 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 kötődésüket a katalitikus alegységhez (Endo és mtsai., 1996; Egloff és mtsai., 1997). A RVxF motívum a PP1c katalitikus centrumától távol lévő hidrofób zsebhez kötődik, e kölcsönhatást a regulátor alegység bázikus aminosavai és a PP1c savas oldalláncai között kialakuló ionos kapcsolatok tovább erősíthetik. A PP1 szabályozó alegységek két csoportba sorolhatók: a katalitikus aktivitást fokozó (úgynevezett célra irányító) és katalitikus aktivitást gátló fehérjék. A regulátor alegységek között azonosították a vázizomban megtalálható glikogénkötő (G_M) alegységet (Stralfors és mtsai., 1985; Tang és mtsai., 1991) és a simaizomban expresszálandó miozinkötő (MYPT1) alegységet (Alessi és mtsai., 1992; Hartshorne és mtsai., 2004). Ez utóbbi jelenlétét és funkcióját már bizonyították a sejtmagban (Moorhead és mtsai., 2007) és az idegsejtekben is (Lontay és mtsai., 2005; Mansuy és mtsai., 2006). 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 inhibitorai (I1, I2) vagy szubsztrátjai (Rb, Nek2, AKAP149) is (Ceulemans és mtsai., 2002). Az inhibitorok általában 14-32 kDa tömegű hőstabil molekulák (I1, I2, CPI-17), amelyek a

PP1c-hez kötődve gátolják annak katalitikus aktivitását. A PP1c aktivitását a Thr320 oldalláncának sejtciklus-függő foszforilációja is gátolhatja (Kwon és mtsai., 1997). Hasonló gátló mechanizmus a PP2Ac tirozin foszforilációján keresztül is megvalósulhat (Barisic és mtsai., 2010; Luo és mtsai., 2013).

A PP2A funkciója és szerkezete

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 (Janssens és mtsai., 2001), valamint tumorszupresszor hatása is van (Janssens és mtsai., 2005; Mumby és mtsai., 2007). A PP2A sokoldalúsága annak tulajdonítható, hogy a PP1 enzimesaládhoz hasonlóan sokféle regulátor alegységgel lép kölcsönhatásba. A PP2A szabályozási mechanizmusa rendkívül bonyolult. Az enzim heterotrimer (3. ábra), amelyet a PP2Ac, az A (PR65) állvány alegység és a B regulátor alegység épít fel.



3. ábra A PP2A holoenzim szerkezete
(módosított ábra, Shi, 2009)

A zöld a katalitikus, a bronz a regulátor és a szürke szín az állvány alegységet jelöli.

A katalitikus és állvány alegységnek α és β izoformája közül az α tízszer gyakrabban fordul elő, és az A alegység két izoformája 87 %-ban megegyezik egymással (Hemmings és mtsai., 1990). 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 betűkombinációkkal jelölik. A B alegységek mindegyikének 2-5 izoformája létezik, így számos trimer holoenzim jöhet létre ezek variációjaként (Millward és mtsai., 1999; Xu és mtsai., 2006; Janssens és mtsai., 2008).

A PP2A szabályozása

A PP2A szabályozása, hasonlóan a PP1-hez, regulátor fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokon keresztül valósulhat meg, amelyek a holoenzimet a szubsztráthoz irányítják. Asszociálódhatnak azonban virális fehérjékkel is, amelyek (a B alegységhez hasonlóan) megváltoztatják a katalitikus alegység aktivitását és szubsztrátspecifitását (Kamibayashi és mtsai., 1994). Szabályozása különböző poszttranszlációs módosításokon, mint például foszforiláció vagy metiláció, keresztül is történhet. Utóbbi módosítás fiziológiai hatása nagymértékben vitatott. Egyesek szerint a karboxil-metiláció növeli az enzim katalitikus aktivitását és kölcsönhatását a szubsztráttal (Bryant és mtsai., 1999; Gentry és mtsai., 2005; Longin és mtsai., 2008), mások szerint nincs hatással az aktivitásra és a regulátor alegység a metilálatlan katalitikus dimer (AC) alegységhez is hozzákapcsolódik (Xing és mtsai., 2006; Ikehara és mtsai., 2007; Xu és mtsai., 2008). Továbbá tirozin kinázok, növekedési faktorok és inzulin receptorok is részt vehetnek a szabályozásban az enzim inaktivációját okozva (Chen és mtsai., 1992).

A PP2A holoenzim aktivitását a PP1-et gátló I1 és I2 inhibitor fehérjék nem befolyásolják, aktivitásához fémionok nem szükségesek, szemben a Mg^{2+} -függő PP2C-vel. A foszfatáz inhibitor toxinok közül a MC-LR, a kalikulin A (CLA) és az okadánsav (OA) képes gátolni, ezek közül az OA kisebb koncentrációban ($IC_{50} = 0,2 \text{ nM}$) gátolja a PP2A-t *in vitro*, mint a PP1c-t ($IC_{50} = 50-100 \text{ nM}$). Sejteken végezett kísérletek azt mutatták, hogy az OA PP1 enzimre 100 nM koncentráció felett sem hat szignifikáns mértékben, míg a PP2A gátlása már 5-50 nM OA-val is effektív (Favre és mtsai., 1997).

Protein foszfatázok kölcsönhatásainak vizsgálata Biacore kötődési technikával

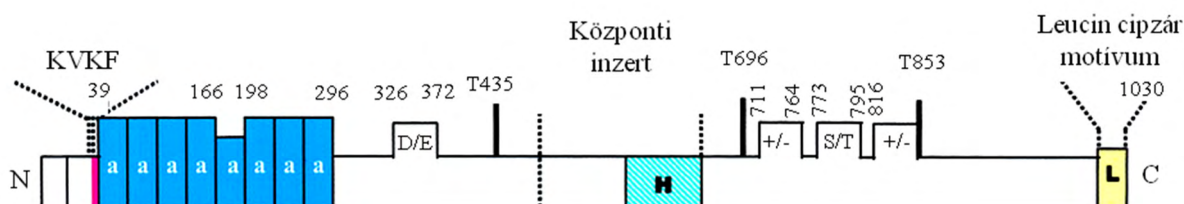
Az SPR (Surface Plasmon Resonance) elven alapuló Biacore készülék lehetőséget nyújt fehérje-fehérje, fehérje-ligandum és fehérje-kismolekula közötti kölcsönhatások tanulmányozására. A bioanalitikában (Liedberg és mtsai., 1995) kifejlesztett SPR detektálási alapú módszer segítségével a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikája valós időben meghatározható a molekulák jelölése nélkül kismennyiségű mintából. Nagy érzékenysége révén a viszonylag alacsony affinitású kölcsönhatások is vizsgálhatók a módszerrel.

Az SPR módszer alkalmas a protein foszfatázok alegységei között kialakuló kölcsönhatások kvantitatív jellemzésére, valamint a regulátor alegység kölcsönható régióinak azonosítására (Toth és mtsai., 2000b; Kiss és mtsai., 2008; Kolozsvári és mtsai., 2012; Kiss és mtsai., 2013). Felhasználható továbbá a katalitikus alegységek inhibitor fehérjékkel és toxinokkal kialakított interakciójának jellemzésére is (Stenlund és mtsai., 2006). A kölcsönhatások elemzéséhez minden esetben szükség van az egyik partner szenzor chip felületén történő immobilizálására, amely lehet közvetlen (például kovalensen, aminos csoporton keresztül a karboximetil dextrán mátrixhoz) vagy közvetett. Az utóbbi lehet reverzibilis, antitest-antigén (pl. anti-GST-vel kovalensen módosított felületre GST-fúziós fehérje kötése) vagy irreverzibilis, a molekulák specifikus (streptavidin-biotin) kölcsönhatásán alapuló immobilizálás. A vizsgálat során meghatározhatók a kölcsönhatás asszociációs-disszociációs kinetikai paraméterei (sebességi állandói, amelyből az egyensúlyi állandó számítható). Az analízishez azonban tisztított fehérjékre van szükség az esetleges aspecifikus kölcsönhatások elkerülése érdekében.

Munkám során számos esetben vizsgáltam a fent leírt módszerrel a miozin foszfatáz holoenzim (MP) MYPT1 regulátor alegységének kölcsönhatását PP1c-vel és feltételezett szubsztrátokkal (Kiss és mtsai., 2008; Czikora és mtsai., 2011; Kolozsvári és mtsai., 2012). Gyakran alkalmaztam a MYPT1-PP1c kölcsönhatást kontroll kísérletként, ezért a következő fejezetben a MYPT1 szerkezetét és a PP1 katalitikus alegységgel, valamint a miozin szubsztráttal kialakított kölcsönhatását mutatom be.

A MYPT1 szerkezete és rokon fehérjéi

A MYPT1 (**M**yo**s**in **P**hos**ph**atase **T**arget subunit **1**) szabályozó alegységet elsőként csirke zúza (Shimizu és mtsai., 1994) és patkány aorta (Chen és mtsai., 1994) könyvtárból klónozták. Azonosítottak egy hosszabb (133 kDa) és egy rövidebb (110-130 kDa) izoformáját is. A méretbeli különbségek a középső inzert, illetve a leucin cipzár jelenlétét vagy hiányát tükrözik. A MYPT1 szerkezete a 4. ábrán látható, 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 szakasz (719-793, 814-848), a Ser/Thr aminosavakban gazdag régió (770-793), valamint a már említett középső inzert (517-553).

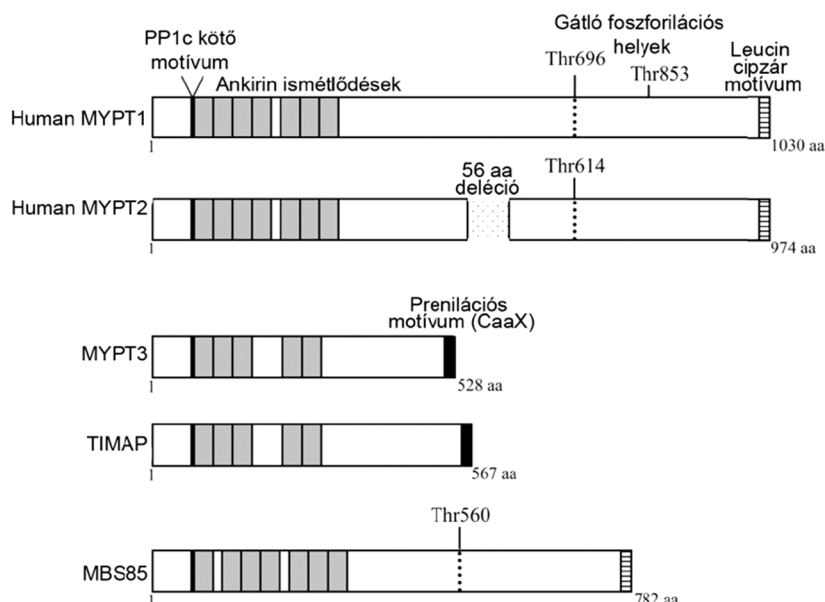


4. ábra A MP MYPT1 regulátor alegységének szerkezete

(módosított ábra, Hartshorne és mtsai., 2004)

MYPT1 jellemző régiók: *N*: N-terminális; *KVKF*: PP1c-jötő motívum; *a*: ankirinszerű ismétlődések; *D/E*: savas régió; *+/-*: ionos szakasz; *H*: központi inzert; *S/T*: Ser/Thr gazdag régió; *T696*, *T853*: jellemző foszforilációs helyek; *L*: leucin cipzár.

A MYPT1-hez hasonló szerkezetű a MYPT2, MYPT3, TIMAP (TGF- β -inhibited membrane associated protein) és MBS85 (Myosin binding subunit 85) fehérjék alkotják a MYPT fehérjecsaládot (5. ábra). Szekvenciájukban több konzervált régiót tartalmaznak, amelyek az N-terminális végén található ankirinszerű ismétlődések, a C-terminálison lévő leucin cipzár motívum, illetve a szekvencia középső részén található gátló foszforilációs helyek. A MYPT1-hez az aminosav sorrendet illetően leginkább a MYPT2 (61 %) és az MBS85 (39 %) fehérjék hasonlítanak. A család mindegyik tagja tartalmazza a PP1c-kötő motívumot, ami a MYPT1 esetén a *KVKF*, a MYPT2-nél *RVRF*, a MYPT3-nál *KHVLF*, a TIMAP-nál *KVSF* és a MBS85-nél a *RTVRF* szekvencia (Ito és mtsai., 2004).



5. ábra A MYPT fehérjecsalád tagjai

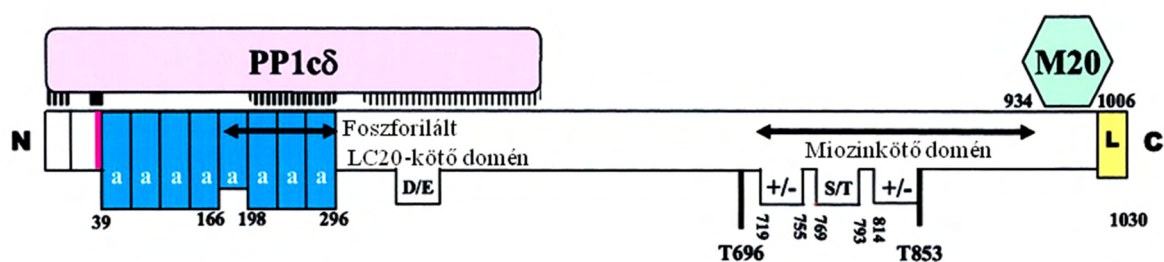
(módosított ábra, Ito és mtsai., 2004)

A MYPT1-hez hasonló szerkezetű a MYPT2, MYPT3, TIMAP és MBS85 fehérjék láthatóak, feltüntetve a jellemző, konzervált régiókat.

MYPT1 kölcsönhatása a PP1 katalitikus alegységgel és a miozin szubsztráttal

A MP katalitikus és regulátor alegységei által kialakított kölcsönhatásban a MYPT1 N- és C-terminális régiói is fontos szerepet játszanak. A miozin szubsztrát foszforilált könnyűlánc (P-MLC20) a MYPT1 N-terminális szakaszának ankirinszerű ismétlődéseihez, míg nehézlánc a C-terminális régióhoz kötődik.

A PP1 katalitikus alegységgel kialakított kölcsönhatásában a MYPT1 N-terminális részének van szerepe (6. ábra), amely tartalmazza a $^{35}\text{KVKF}^{38}$ kötőmotívumot. A kölcsönhatást további három MYPT1 régió stabilizálja. A PP1c-kötő motívum interakcióját követő MYPT1¹⁻²² szakasz kapcsolódása elősegíti az ankirinszerű ismétlődéseket tartalmazó MYPT1⁴⁰⁻²⁹⁶ szakasz, valamint a savas MYPT1³⁰⁴⁻⁵¹¹ régió kötődését (Toth és mtsai., 2000b). Az említett kölcsönhatásokat a MYPT1¹⁻²⁹⁹ és a PP1c δ komplex együttes kristályosítása és annak röntgenszerkezeti vizsgálata is igazolta (Terrak és mtsai., 2004).



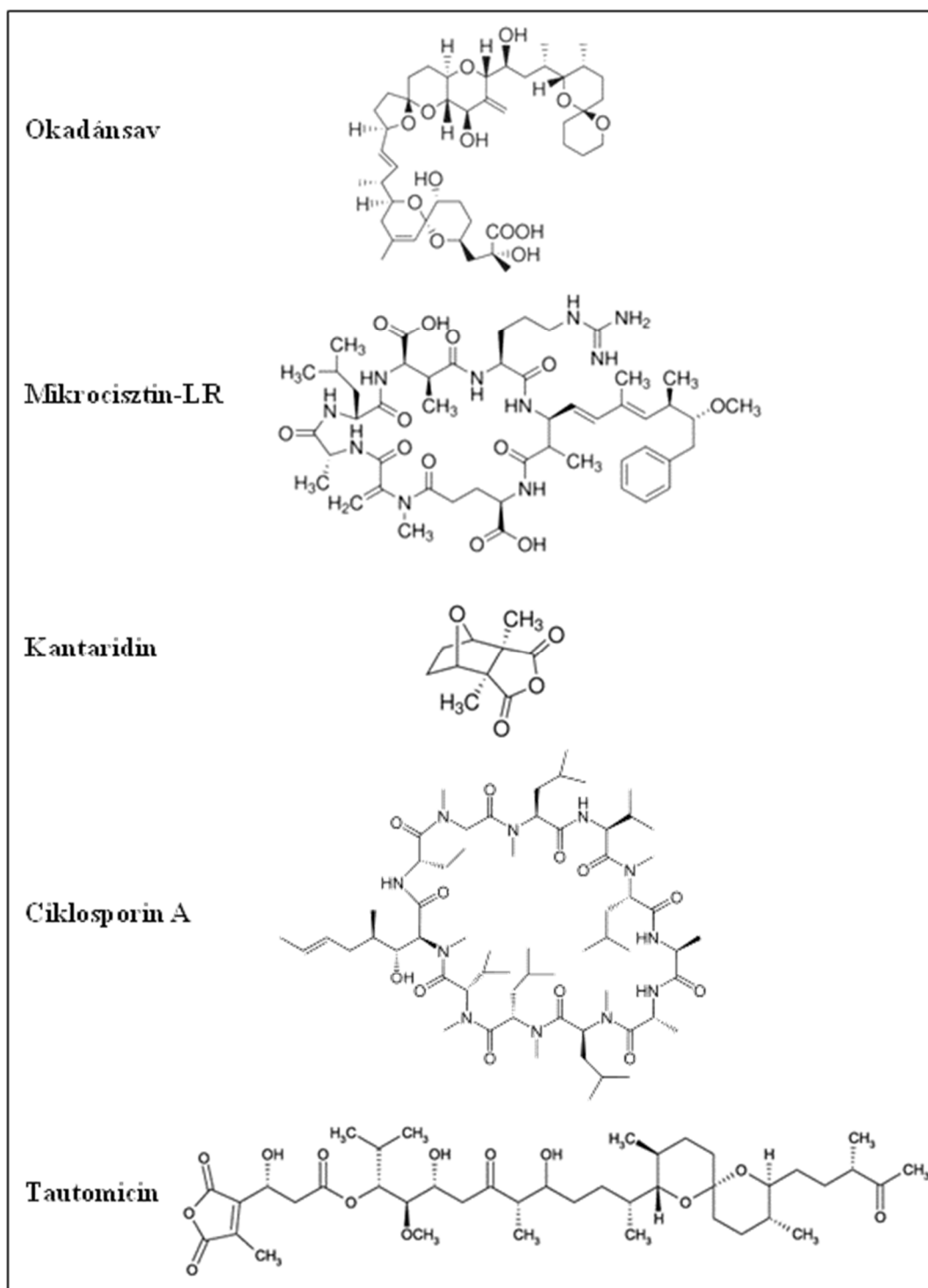
6. ábra A PP1c és a miozin kötődése a MYPT1 regulátor alegységhez

(módosított ábra, Hartshorne és mtsai., 2004)

MYPT1 jellemző régiók (4. ábra), a MYPT1 PP1c-kötő régiója, valamint a MYPT1 miozinnal kialakított kölcsönhatásban szerepet játszó régiók láthatóak.

PP1c és PP2Ac gátlása természetes toxinokkal

Az elsőként azonosított PP1/PP2A inhibitor (Takai és mtsai., 1987) a poliéter zsírsav típusú OA volt, amely hidrofób és savas régiókkal is rendelkezik. Hidrogénkötést alakít ki a PP1 Tyr-272 aminosav, illetve a katalitikus centrum bázikus aminosavainak oldalláncával és kölcsönhatásba lép a hidrofób árokkal (Zhang és mtsai., 2013). A CLA foszfátcsoportjával a fémionkötő helyhez kapcsolódik és kölcsönhatásba lép a savas és hidrofób árokkal (Kita és mtsai., 2002). A mikrocisztinek leginkább karakterizált formája a MC-LR, amelynek szerkezetében a második aminosav L-leucin (jele: L), a negyedik L-arginin (jele: R) (Boaru és mtsai., 2006). A mikrocisztinek hatékony, irreverzibilis foszfatázgátló szerek (Wiegand és mtsai., 2005), kölcsönhatásuk során az ADDA hidrofób részük behatol a PP1c katalitikus centrumának hidrofób árkába (Goldberg és mtsai., 1995), így gátolva annak katalitikus



7. ábra **Membránpermeábilis foszfatázgátló toxinok szerkezete**

aktivitását, miközben az MDHA alegység metilén-csoportján keresztül kovalensen kapcsolódik a PP1c Cys-273 oldalláncával. Mutagenézis vizsgálatokkal kimutatták, hogy a ciszteinnel való kölcsönhatás nem esszenciális a gátlás kifejtéséhez, cseréje más aminosavra csak kismértékben csökkentette a gátló hatását (Zhang és mtsai., 1993). Az OA hatékonyabban csökkenti a PP2A aktivitását, mint a PP1 enzimét. Ezzel szemben a tautomycin (TM) alacsonyabb koncentrációban gátolja a PP1-et, mint a PP2A-t (Favre és mtsai., 1997). A

MC-LR és CLA hasonló mértékben hat mindkét enzimre. A ciklosporin A (CsA) komplexet képez a sejtben a ciklofilinnel és specifikusan gátolja a PP2B-t, míg a PP1 és a PP2A aktivitására nincs hatással. A kantaridin (CA) és származékai mind a PP1, mind a PP2A enzimek aktivitását gátolják (Li és mtsai., 1992). Az általunk vizsgált membránpermeabilis foszfatázgátló toxinok szerkezetét a 7. ábra szemlélteti.

Tanninok hatása a protein foszfatázok aktivitására

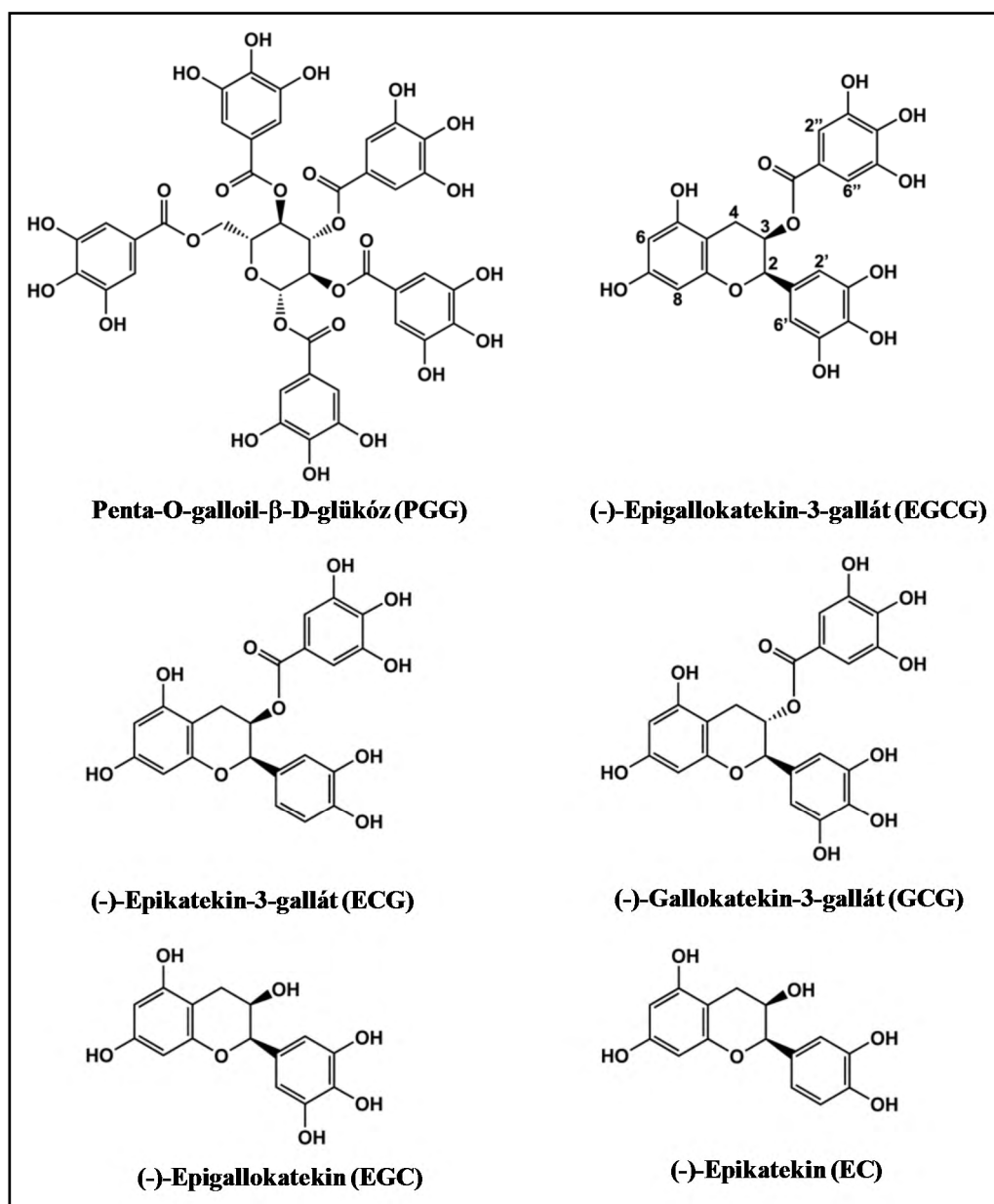
A tannin kifejezés a tölgyfa kelta eredetű nevéből ered. A tanninok különböző molekulatömegű és kémiai szerkezetű vízben oldódó polifenol vegyületek, amelyek a szövetes növények tannoszóma nevű sejtszervecskéjében termelődnek. Sokféle biológiai hatással rendelkeznek: képesek fémionokat kötni, fehérjéket kicsapni és hatékony antioxidánsok. Sokszínűségük óriási szerkezeti variációikból ered. A tanninok központi molekulája mindig valamilyen polihidroxi vegyület (flavonol, glükóz), amelyhez észter kötéssel egy vagy több fenolos hidroxil-csoportot tartalmazó gyűrűs molekula (pl. galluszsav vagy más polifenol gyűrű) kapcsolódik.

A zöld teában legnagyobb mennyiségben jelen lévő polifenol az (-)-epigallokatekin-3-gallát (EGCG), amelynek biológiai hatásait már igen széles körben tanulmányozták. Központi molekulája a flavan-3-ol, amelynek 2. szénatomjához egy polifenolgyűrű, 3. szénatomjához pedig egy galluszsav kapcsolódik. Jól ismert daganatellenes hatása van. Gátolja a sejtek proliferációját, apoptózist indukál számos daganatos sejtvonalban, míg normál sejtekre nincs hatással (Ahmad és mtsai., 1997). Hatásmechanizmusa nem teljes mértékben felderített, viszont sejtosztódást gátló tulajdonsága irodalmi adatok szerint a protein kinázok szabályozásán alapul. Ide sorolhatók a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK: Erk1/2, JNK vagy a p38), az I κ B, az AKT kinázok és a PKC (Qin és mtsai., 2008), amelyek aktiválása révén az EGCG fontos jelátviteli útvonalak (AP1, NF- κ B, PI3K/AKT) szabályozásában vehet részt (Khan és mtsai., 2006). Számos rokonvegyülete létezik, amelyek vagy a galluszsav térállásában (GCG) vagy a hidroxil-csoportok számában (ECG, EGC, EC) térnek el az alapvegyülettől (8. ábra).

A legegyszerűbb hidrolizálható tanninvegyület a poligalloilészter glükóz, amelyben a központi β -D-glükózmolekula hidroxil-csoportjaihoz öt galluszsav kapcsolódik észterkötéssel. Az 1,2,3,4,6-penta-O-galloil- β -D-glükóz (PGG) alfa izomerje a természetben nem található meg. Számos izoformája ismert, amelyek különböző kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A PGG hasonló biológiai hatásokat vált ki, mint az EGCG.

A kereskedelemben található tanninsavak különböző tanninok keverékei, amelyek megtalálhatóak a szömörce levelében, gubacsában vagy a tölgyfa gubacsában (pl. Aleppói tannin).

Korábban kimutatták a gallotanninok PP1 és PP2A gátló hatását (Erdelyi és mtsai., 2005), amelyek alapján ezek a vegyületek új foszfatázgátló molekulák családját képezhetik, azonban gátlási mechanizmusuk még nem tisztázott.



8. ábra A PGG, EGCG és származékaik szerkezeti képlete

Foszfataz inhibitorok hatásmechanizmusa

A membránpermeabilis enzim inhibitorok gátlási mechanizmusában fontos szerepe van a molekulák membránnal történő asszociációjának, illetve e kölcsönhatás asszociációs–disszociációs kinetikájának. Favre és munkatársai (1997) vizsgálták a CLA, OA és a TM foszfatazgátló hatását különböző sejtvonalakon. Azt találták, hogy a TM a PP1, az OA a PP2A, míg a CLA mindkét enzim aktivitását azonos mértékben csökkentette. A PP2A teljes gátlásához MCF7 sejteket 3 nM OA-val kezelték, ami jóval nagyobb (75-szörös), mint az OA-PP2A kölcsönhatásra jellemző disszociációs egyensúlyi állandó ($K_i = 40$ pM). Vizsgálták még a TM és az OA PP1 és PP2A enzimekre kifejtett gátlásának idő- és koncentrációfüggését. Azt az eredményt kapták, hogy a PP1 teljes gátlásához 10 μ M TM, míg a PP2A-hoz 100 nM OA szükséges azonos inkubációs idő (12 h) mellett. Azt is tapasztalták, hogy a TM, az OA és a CLA membránpermeabilitása nagymértékben eltérő. Korábbi vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a CLA sokkal gyorsabban jut át az egerek vörösvértestének membránján, mint a hidrofób karakterű OA. A membránon való átjutást nagymértékben befolyásolta a pH és a hőmérséklet (Namboodiripad és mtsai., 1996).

Ezen kísérleti eredményekből arra következtethetünk, hogy az inhibitorok gátló hatásának kifejtésében fontos szerepe van azok sejtmembránnal való kölcsönhatásának és azon való átjutásának.

Gyógyszerek és toxinok membránasszociációs és -disszociációs vizsgálatának modellezése lipid micellákhoz való kötődéssel

Az SPR detektáláson alapuló mérési technika alkalmas membránasszociációs és -disszociációs folyamatok vizsgálatára. A lipid micellákkal borított felszín felett áramoltatott gyógyszerek kötődése során bekövetkező rezonanciajel-változás a kölcsönhatás kialakulását mutatja. Számos más módszer létezik ezen kölcsönhatások vizsgálatára, mint például cirkuláris dikroizmus, tömegspektrometria, analitikai elektroforézis, ultracentrifuga, mikroszkópia vagy kalorimetria, viszont ezek a módszerek néhány kivételtől eltekintve csak kvalitatív információkat adnak a különböző molekulák lipid micellákkal kialakított kölcsönhatásáról. Ezzel szemben az SPR módszerrel meghatározható a kötődés asszociációs–disszociációs profilja, valós időben nyomon követhető és automatizálható a folyamat. Számos esetben alkalmazták már homogén (Abdiche és mtsai., 2004) és inhomogén (Cho és mtsai., 2004; Besenicar és mtsai., 2006) összetételű membránok különböző kismolekulákkal kialakított kölcsönhatásának karakterizálására. Az tapasztalták, hogy a kölcsönhatásokban

fontos szerepe van a molekulák töltésének, funkciós csoportjának, a lipid hidrofil fejrészének és az oldószer összetételének (Abdiche és mtsai., 2004), viszont független a micella méretétől.

A módszer alkalmas egy-, illetve kétrétegű lipidfelület kialakítására HPA és L1 típusú szenzor chipek alkalmazása révén. A chipen kialakított egyrétegű lipidfelület olyan kísérletek elvégzését teszi lehetővé, amelynek során a ligandum a membránhoz kötődik vagy részlegesen be is épül annak szerkezetébe. A lipid kettősréteg pedig felhasználható transzmembrán fehérjék különböző kölcsönhatásainak, illetve membránpermeabilis molekulák és toxinok micellákkal kialakított kapcsolatának elemzésére. Általában a lipid micella a vizsgálat során intakt marad (Cooper és mtsai., 2000; Anderluh és mtsai., 2005; Honing és mtsai., 2005), bár az irodalomban találhatunk példát azok felbomlására, majd kettősréteg kialakulására a chip felületén (Erb és mtsai., 2000; Cooper és mtsai., 2004).

Fehérjék kölcsönható partnereinek azonosítása sejtlizátumból

A SPR detektálási elven alapuló mérési technika alkalmas fehérjék kölcsönható partnereinek izolálására különböző fehérjekeverékekből, sejtlizátumokból, majd a visszanyert mintában lévő fehérjék azonosíthatóak megfelelő immunológia módszerrel vagy tömegspektrometriával (Nedelkov és mtsai., 2003; Catimel és mtsai., 2005). A biomolekuláris interakció analízis (BIA) tömegspektrometriával (MS) való kapcsolása vezetett a BIA/MS módszer kidolgozásához. A BIA/MS technikát sikeresen alkalmazták olyan kölcsönható fehérjék izolálására és azonosítására, amelyben aktivátor molekulát (Visser és mtsai., 2007), epitópokat (Nelson és mtsai., 1999), GST-fúziós fehérjéket (Lopez és mtsai., 2003) vagy több antitest egyazon szenzor chip felületére történő immobilizálásával multi-affinitású felületeket (Nedelkov és mtsai., 2003) használtak „befogó” molekulaként. A visszanyert mintában a kölcsönható fehérjéket közvetlenül, vagy folyadékkromatográfiás elválasztás után tömegspektrometriával (LC-MS) elemezték. Modern készülékek (Biacore 3000) rendelkeznek egy külső egységgel, amelyben a szenzor chip felületének több mint háromszorosa használható immobilizálásra, mint az integrált mikrofluid rendszerben, amellyel arányosan növelhető a felület kötőkapacitása is.

Célkitűzések

A gallotanninok PP1 és PP2A enzimek aktivitására kifejtett gátló hatását már korábban kimutatták (Erdelyi és mtsai., 2005), viszont az irodalmi áttekintésből kitűnik, hogy a gátlás mechanizmusa, típuspecificitása, valamint az, hogy a tanninok különböző szerkezeti egységei milyen mértékben vesznek részt a gátlásban, nem ismertek. A bemutatott irodalom alapján látható, hogy a 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 utalnak arra, hogy a protein foszfatáz katalitikus alegységek szabályozása különböző regulátor vagy inhibitor fehérjékkel kialakított kölcsönhatásukon keresztül valósulhat meg, amely befolyásolja az adott sejtfolyamat lejátszódásának irányát vagy bekövetkezését. Ezek feltárása a jelenleg elérhető modern módszerekkel azonban nem teljesen vizsgált.

A bemutatott irodalmi adatok és felvetett kérdések alapján kutatási célkitűzéseink az alábbi kérdések tanulmányozása köré csoportosultak:

1. A polifenolok gátló hatásának tanulmányozása a PP1 és a PP2A enzimek aktivitására.
2. Az EGCG és a PGG polifenolok kötőhelyének felderítése a PP1c szerkezetében SPR módszerrel.
3. Foszfatáz inhibitorok különböző szöveti eredetű lipid micellákkal kialakított kölcsönhatásának kvantitatív jellemzése: új adatok feltárása a sejtszintű gátlás mechanizmusának megértéséhez.
4. Új SPR detektálási elven alapuló módszer kidolgozása a protein foszfatázok kölcsönható partnereinek azonosítására sejtlizátumból a sejtek eltérő kezelését követően.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A kísérletekhez az alábbi vegyszereket és anyagokat használtuk a megjelölt forrásokból: L-glutamin oldat, tripszin, borjúsérum (FBS), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápoldat (Invitrogen); teljes mini proteáz inhibitor koktél tabletták (Roche); trifluorecetsav (TFA), etánditiol (EDT), 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav (HEPES), EGCG, OA, TM, BSA, Chaps (Sigma); CA (LC Services); MC-LR (Dr. Máthé Csaba, Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Növénytani Tanszék); nitrocellulóz membrán (0,45 µm pórusméret) (GE Healthcare); Streptavidin/Biotin blokkoló kit (Vector Lab.); N-jódacetyl-N-biotinilhexilendiamin, tris-(2-carboxietil)foszfín-hidrokloridot (TCEP) (Pierce); CLA, panPP1 siRNS (Santa Cruz); BCA (bikinkoniniksav) fehérje-meghatározó kit, nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagens, DharmaFECT 2 transzfekciós reagens (Thermo Scientific); Szenzor Chip CM5, SA, L1, Amin Kapcsolási kit (Biacore AB); ProLong Gold Antifade Reagens DAPI-val (Invitrogen); [γ -³²P]ATP (Izotóp Intézet Kft, Budapest); agy, szív és máj teljes lipid kivonat (Avanti Polar Lipids). HaCaT (CLS Cell Lines Service GmbH); B50 (neuroblastóma), H9C2 (kardiomioblaszt) és HepG2 (hepatokarcinóma) (European Collection of Cell Cultures) sejtvonalak. Minden más vegyszer a kereskedelmi forgalomban kapható (Sigma, Reanal) legnagyobb tisztaságú volt.

Antitestek

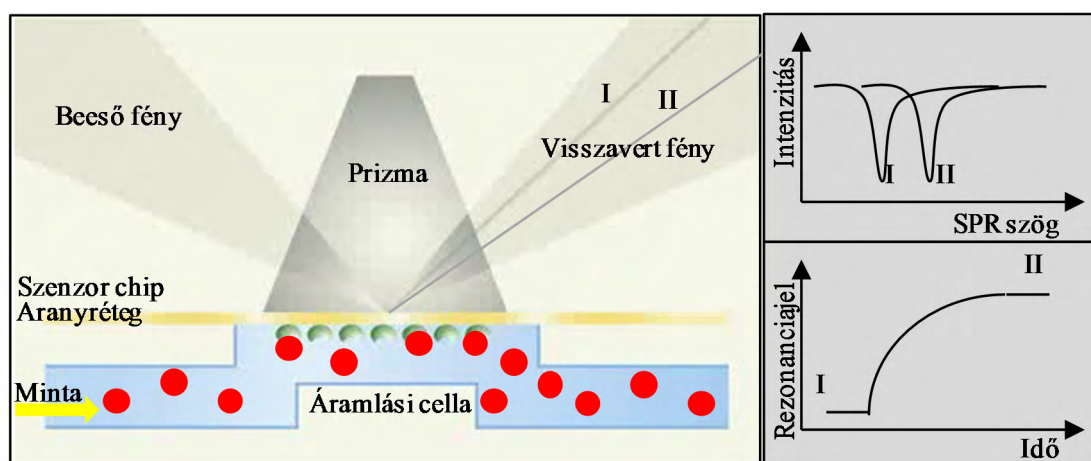
Az antitesteket a feltüntetett irodalmi hivatkozásokban leírtak szerint alkalmaztuk, vagy kereskedelmi forgalomból szereztük be és a gyártók útmutatásai szerint használtuk. Anti-PP1c(E9, PP1 α/γ specifikus) (1000-szeres hígítás TBST-ben) (Santa Cruz Biotech.), anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (500-szoros hígítás TBST-ben) (Lontay és mtsai., 2004), anti-PP2A-A és -B alegység (1000-szeres hígítás TBST-ben) (Cell Signaling Tech.); anti-PP1c δ (500-szoros hígítás TBST-ben), monoklonális anti-PP2Ac (1000-szeres hígítás TBST-ben) (Upstate Biotech.); anti-PPM1B (1000-szeres hígítás TBST-ben) (Abnova); anti-PPP1R2 (Inhibitor 2), anti-GST (Sigma) (1000-szeres hígítás TBST-ben); nyúl poliklonális anti-TIMAP (500-szoros hígítás TBST-ben) (Zymed Laboratories); tormaperoxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl és anti-egér IgG (8000-szeres hígítás TBST-ben) (Sigma); Alexa 594 konjugált anti-egér IgG (200-szoros hígítás TBST-ben) (Molecular Probes); Alexa 488 konjugált Streptavidin (200-szoros hígítás TBST-ben) (Pierce).

Fehérjék és peptidek

A hexahisztidin-tag-gel ellátott rekombináns PP1c δ izoformát M15 E. coli sejtvonalban expresszáltuk és affinitás kromatográfiával Ni-NTA Superflow oszlopon tisztítottuk (Toth és mtsai., 2000a). A natív PP1c-t nyúl vázizomból izoláltuk, a PP2Ac-től heparin-Sepharose oszlopon választottuk el (Gergely és mtsai., 1984), majd FPLC-MonoQ oszlopon (Muranyi és mtsai., 1998), illetve MYPT1¹⁻²⁹⁶ immobilizálásával affinitás kromatográfiával tovább tisztítottuk (Toth és mtsai., 2000b). A 133 kDa méretű MYPT1 izoformát (GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴), valamint C-terminális fragmentumát (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) glutation-S-transzferáz fúziós fehérjeként expresszáltuk és Glutation-Sepharose oszlopon tisztítottuk (Feng és mtsai., 1999). A MYPT1 N-terminális mutánsait (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶, His-MYPT1¹⁻⁶³³) hexahisztidin-tag-gel expresszáltuk E. coli M15 sejtekben (Hirano és mtsai., 1997). A foszfoszubsztrátot pulyka zuzából preparált miozin (Wu és mtsai., 2003) és izolált 20 kDa méretű könnyűlánc foszforilációjával (Erdodi és mtsai., 1995) állítottuk elő.

Biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálata SPR detektáláson alapuló módszerrel

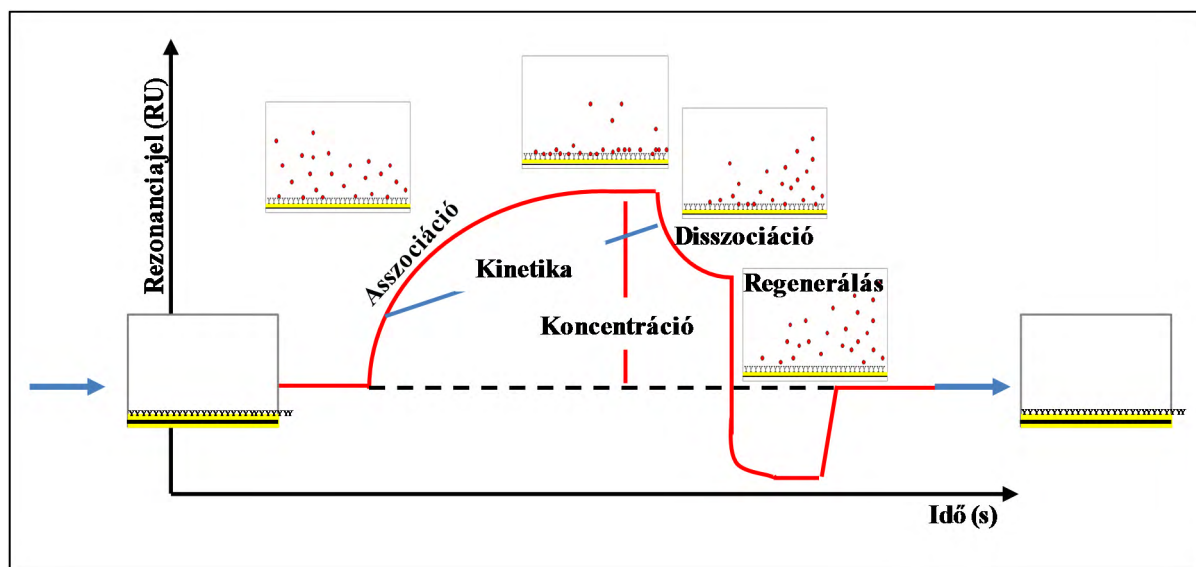
A felületi plazmonrezonancia két különböző törésmutatójú réteg határfelületén, az elektronvezetési rétegben játszódik le. A BIAcore rendszerben az egyik közeg (dielektrikum) az üveglap, a másik a mintaoldat, a vezető réteg pedig a szenzor chip felületén (üveglap) található vékony (~50 nm) aranyréteg.



9. ábra Az SPR alapú bioanalitikai módszer detektálási elve

Az egyik kölcsönható partnert immobilizáljuk a szenzor chip felületén, míg a másik partnert oldatban áramoltatjuk a felület felett. A molekulák kötődése az oldatból az immobilizált ligandumhoz megváltoztatja a felületi körülményeket, amely a rezonanciajel eltolódását okozza. A kapott jel arányos a felülethez kötődött anyag mennyiségével.

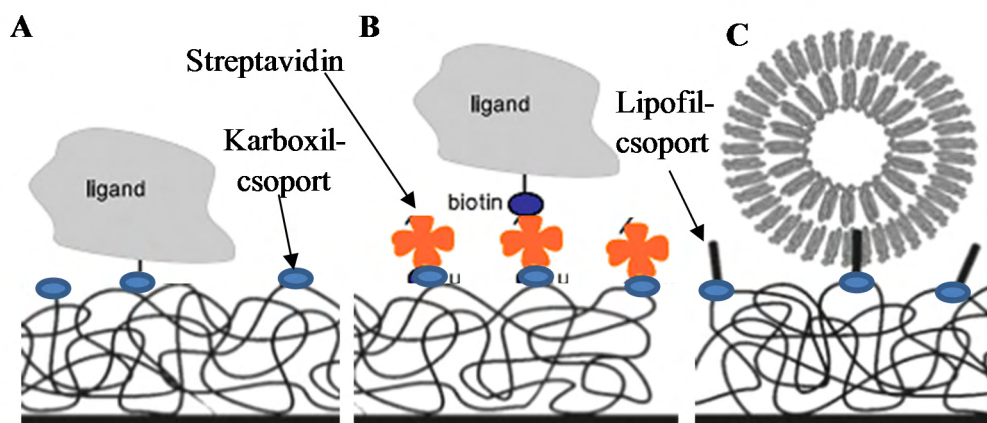
Az adott szögterületben beeső fény (LED, $\lambda=800\text{ nm}$) gerjeszti a felületi plazmonokat (elektronokat) az aranyrétegben és az így keletkezett elektromágneses (evaneszcens) hullám behatol a mintaoldatba ($\sim 150\text{ nm}$), a visszavert fény ilyenformán érzékeny a felszínhez kötődő anyagra. A felszínhez kötődő molekulák pedig megváltoztatják a lokális törésmutatót, amely hatással van a plazmonhullámok rezonancia-feltételeire. Így a felülethez kötődés során a rezonanciához tartozó csökkent intenzitású sáv szög eltolódik (9. ábra). Abban az esetben, ha megváltoznak a felületi körülmények (hőmérséklet, pufferösszetétel, felülethez kötődött anyag mennyisége), akkor megváltozik az SPR-szög. Mivel a rendszer izoterm beállítások mellett működik, illetve állandó pufferösszetételt alkalmazunk, ezért az SPR-szög csak a felülethez kötődött anyag mennyiségének függvényében változik. A módszer lényege, hogy az egyik kölcsönható partnert immobilizáljuk a szenzor chip felületén, míg a másik partnert áramoltatjuk a felszín felett. 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 (asszociációs és disszociációs sebességi állandók: k_a és k_d , meghatározására, amelyből a kölcsönhatásra jellemző egyensúlyi állandók (K_A , K_D) számolhatók), valamint ismeretlen oldat koncentrációjának meghatározására is (10. ábra).



10 ábra Az SPR szenzorgram

A kölcsönható partner asszociációja a szenzor chip felületére a rezonanciajel növekedését okozza. A felület telítődése után a jel már nem emelkedik tovább és az injektálás megszüntetését követően, a felület pufferrel való mosása során a molekulák disszociálnak, majd (ideális esetben) regenerálás után a rezonanciajel visszaáll a kiindulási szintre.

Kísérleteim során CM5, SA és L1 típusú szenzor chipeket használtam. A CM5 chip (11. ábra A) karboximetil dexrán mátrixot tartalmaz, amely alkalmas amino-, tiol-, illetve aldehid-csoporton keresztül történő kovalens immobilizálásra. Az streptavidinnel kovalensen módosított SA chip (11. ábra B) biotinilált fehérjék, molekulák immobilizálására használható.



11. ábra A: CM5, B: SA, C: L1 szenzor chip szerkezete

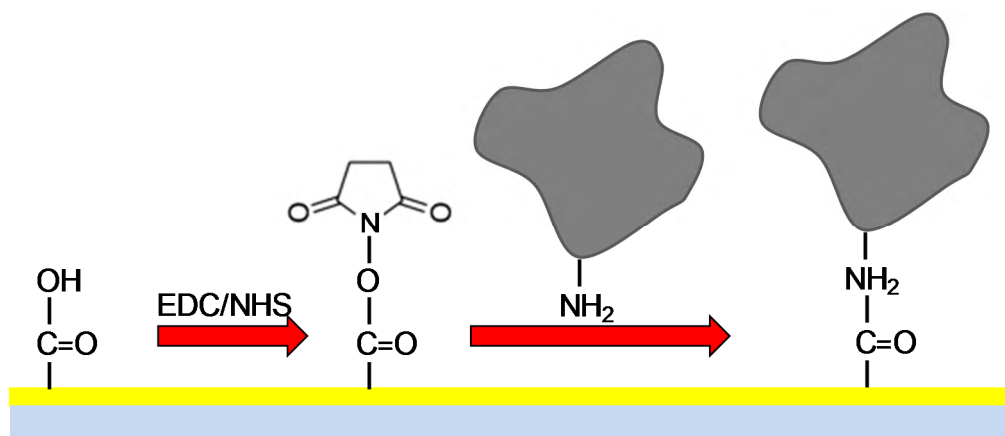
A bemutatott szenzor chippek karboximetil dexrán alpmátrixszal rendelkeznek, amely vagy streptavidinnel (SA) vagy lipofil-csoporttal (L1) van kovalensen módosítva.

Az L1 chip (11. ábra C) lipid micellák megkötésére alkalmas, mivel a karboximetil dexrán mátrix olyan lipofil molekulát tartalmaz, amely képes beépülni a micellák szerkezetébe, ezáltal stabilan rögzítve azokat a chip felületén.

A tanninok rPP1c δ -hoz való kötődésének vizsgálata SPR módszerrel

A vizsgálat során rekombináns PP1c δ -t kovalensen, amino-csoporton keresztül immobilizáltuk a CM5 szenzor chip felületére (Stenlund és mtsai., 2006), amelynek mechanizmusa a 12. ábrán látható.

A rPP1c δ -t 1 μ M koncentrációra hígítottuk az immobilizációs pufferben (10 mM Na-acetát (pH=5,5), 1 mM DTT, 2 mM MnCl₂), amely 5 μ M OA-t tartalmazott, hogy elkerüljük az enzim aktív centrumon keresztül történő immobilizációját. A tanninokat 25 mM Tris-Cl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM MnCl₂, 0,05 % Surfactant P20 összetételű pufferben hígítottuk 1-50 μ M koncentráció-tartományban. Minden esetben 70 μ l térfogatú oldatot injektáltunk 10 μ l/min áramlási sebesség a PP1c-vel borított szenzor chip felületére, amelyet 6 perc disszociációs szakasz követett. A felületet 1 M etanolamint tartalmazó oldattal (pH=8,5) regeneráltuk (20 μ l/min, 1 min).



12. ábra Immobilizálás a karboximetil dextrán alapú CM5 chip felületére

A chip felületét 200 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) és 50 mM N-hidroxi-szukcinimid (NHS) 1:1 arányú oldatával aktiváltuk (7 perc, 5 μ l/min), az így keletkezett reaktív szukcinimid észter spontán reakcióba lép az amino-csoporttal, amely az adott molekula immobilizációjához vezet.

Kétféle kompetíciós kísérletet végeztünk a tanninok kötődési helyének felderítésére a PP1c szerkezetében, amelyhez OA-t és MC-LR-t használtunk, mivel ezek enzimmel való kölcsönhatási mechanizmusa ismert. A szenzor chip felületén immobilizált rPP1c δ -t 1 μ M MC-LR vagy 5 μ M OA oldatával telítettük, majd (OA esetén ugyanezen inhibitor koncentráció mellett) 10 μ M PGG-t vagy 5 μ M EGCG-t injektáltunk a felületre. COINJECT típusú injektálást alkalmaztunk, amely lehetővé teszi a két injektálás folyamatos, szünet nélküli kivitelezését.

Kidolgoztunk egy speciális PP1c immobilizálási technikát is: a biotin-MC-LR-t immobilizáltuk streptavidinnel kovalensen módosított SA chip felületére (5 perc, 5 μ l/min), amelyre rPP1c δ -t 1 μ M koncentrációban telítésig injektáltunk (~10 perc, 10 μ l/min). A biotin-MC-LR-rPP1c kölcsönhatás elegendően erős ahhoz, hogy az immobilizált biotin-MC-LR stabilan a felületen tartsa az enzimet. Az immobilizálási szakaszt 15 perces mosás követett, azért, hogy eltávolítsuk az aspecifikusan kötődött enzimet. A biotin-MC-LR-rPP1c komplexszel borított felületre a fent alkalmazott koncentrációban PGG-t és EGCG-t, valamint kontrollként Flag-MYPT1 1 μ M-os oldatát injektáltuk. A kölcsönhatások vizsgálatát (25 °C) izoterm körülmények között végeztük. A szenzorgramok kiértékelését BIAevaluation 3.1 szoftverrel végeztük.

Lipid micellák preparálása

Borjú agy, szív és máj teljes lipid kivonatokból micellákat készítettünk, amelyek összetételét az 1. táblázat szemlélteti. A micellákat, összetételüktől függetlenül, azonos

módon preparáltuk az irodalomban már korábban leírtak szerint (Abdiche és mtsai., 2004). 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.

1. táblázat Az agy, szív és máj teljes lipid kivonatok összetétele

Összetétel	m/m %
Agy teljes lipid kivonat	
Foszfatidiletanolamin	16,7
Foszfatidilszerin	10,6
Foszfatidilkolin	9,6
Foszfatidsav	2,8
Foszfatidilinozitol	1,6
Egyéb	58,7
Szív teljes lipid kivonat	
Foszfatidiletanolamin	6,8
Foszfatidilinozitol	2,5
Kardiolipin	2,3
Foszfatidilkolin	5,4
Foszfatidsav	1,1
Neutrális lipidek	49,8
Egyéb	32,1
Máj teljes lipid kivonat	
Koleszterol	7,0
Foszfatidiletanolamin	22,0
Foszfatidilinozitol	8,0
Foszfatidilkolin	42,0
Lizofoszfatidilinozitol	1,0
Egyéb, beleértve a neutrális lipideket	20,0

Az így kialakult micellák mérete nagyfokú inhomogenitást mutatott, ezért a lipid szuszpenzió homogenizálását 100 nm pórusátmérőjű polikarbonátszűrőn való többszöri átpréseléssel végeztük Avanti Mini-Extruder segítségével. Az extruder magában foglal két Hamilton fecskendő, amely közre fogja a fémházba zárt, teflongyűrűkkel határolt polikarbonátszűrőt. A lipid szuszpenziót betöltöttük az egyik fecskendőbe, majd a szűrőn keresztül átpréseltük a másikba. Ezt a folyamatot addig ismételtük, ameddig a membrán által kifejtett ellenállás nem csökkent tovább (~15), majd a homogenizált szuszpenziót a betöltéssel ellentétes oldalon nyertük ki, ezáltal elkerülhető az, hogy a kiindulási oldatból a membránhoz tapadt aggregált

lipidek és egyéb összetevők elszennyezzék a mintát. A lipid szuszpenziót az immobilizáló pufferben tovább hígítottuk ~1 mg/ml koncentrációra.

Lipid micellák immobilizálása L1 típusú szenzor chip felületére

Az L1 típusú szenzor chip felületét 20 mM Chaps 3×1 perces (100 µl/min) injektálásával megtisztítottuk az esetleges szennyezőktől, amelyet az injektáló rendszer alapos mosása (routine Extraclean program) követett. Erre azért volt szükség, hogy teljes mértékben megszabaduljunk az injektáló rendszerben maradt Chaps vagy más detergens molekuláktól, amelyek a micellák immobilizációját gátolhatják. Az agy, szív és máj lipidekből preparált micellák oldatát izolált cellákban 2 µl/min áramlási sebességet alkalmazva telítésig történő injektálással immobilizáltuk. Az lipid micellák átlagos immobilizációja 7500 ± 200 rezonanciajel (RU) egységnek adódott. A referencia (lipid mentes) és a három különböző összetételű micellával borított felszint 0,1 mg/ml BSA oldattal blokkoltuk (5 µl/min, 15 min). A BSA stabilan képes kötődni a lipofil csoporttal módosított karboximetil dextrán felületéhez, így blokkolva a kontroll és a micellák által borított felszínen szabadon maradt lipofil molekulákat (Erb és mtsai., 2000; Cho és mtsai., 2004). Végül a felületeket 100 µl/min áramlási sebességgel három percig mostuk, hogy eltávolítsuk az instabilan kötődött micellákat és BSA molekulákat.

Protein foszfatáz inhibitorok membránasszociációs vizsgálata SPR módszerrel

A foszfatázgátló molekulák különböző lipidösszetételű micellákkal kialakított kölcsönhatását SPR módszerrel vizsgáltuk. A membránasszociációs és -disszociációs vizsgálatokat 20 °C-on és fiziológias hőmérsékleten is elvégeztük, amelyhez L1 típusú szenzor chipet használtunk. A protein foszfatáz inhibitorokat 10 mM Hepes (pH=7,4), 150 mM NaCl oldatában hígítottuk különböző koncentrációkban. 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 összetételű micellát tartalmazó felületre. Az egymás utáni injektálás azért volt lehetséges, mert az inhibitorok teljes mértékben disszociáltak a micellák felületéről az injektálás megszüntetését követően. Minden koncentrációsorozat után a felületeket regeneráltuk 4:6 v/v % izopropanol/50 mM NaOH elegyével 100 µl/min áramlási sebességgel egy percig, amelyet további egy perces 20 mM Chaps oldattal történő mosás követett. A szenzor chip felületét minden mérés előtt friss lipid

micellákkal borítottuk be. A szenzorgramok kiértékelését BIAevaluation 3.1 szoftverrel végeztük.

Sejtkultúrák fenntartása, kezelése foszfatáz inhibitorokkal és besugárzása UVA fénnel

European Collection of Cell Cultures-től (ECACC) származó neuroblasztóma (B50), kardiomioblaszt (H9C2) és hepatokarcinóma (HepG2), valamint CLS Cell Lines Service GmbH által forgalmazott humán keratinocita (HaCaT) sejtvonalat használtunk kísérleteink kivitelezése során. A sejtek tenyésztése 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ 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.

A foszfatáz inhibitorokkal való kezelés előtt a sejteket 16 órán keresztül szérummentes médiumban tartottuk, amelynek hatására a sejtek osztódása leállt és azonos fázisba kerültek. A B50, H9C2 és HepG2 sejteket 60 percig inkubáltuk OA, TM, MC-LR, CA, EGCG oldatával, amelyeket szintén szérummentes médiumban oldottunk három különböző koncentrációban. Az inhibitor kezelés hatását foszfatáz aktivitásmérésekkel vizsgáltuk. Az inkubációs idő leteltével az inhibitorok oldatát leszívtuk a sejtekről, majd első lépésben PBS-sel, ezt követően pedig TBS, 0,1 mM EDTA összetételű oldattal mostuk. A sejteket 50 mM merkaptotetanolt, 0,1 mM EDTA és 0,5 % proteáz inhibitor koktélt tartalmazó TBS-ben kapartuk fel, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk, 10 percig szonikáltuk és a sejttörmelékét centrifugálással (16 000 g, 10 perc) távolítottuk el. A foszfatáz aktivitás meghatározása a centrifugálással nyert felülúszókból történt.

HaCaT sejteket 100 nM CLA oldattal kezeltük vagy 10 J/cm² UVA fénnel besugároztuk Bio-Sun UV besugárzó kamrában (Vilbert Lourmat, France). A sejteket PBS-sel mostuk, majd jéghideg RIPA pufferben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7,4) kapartuk fel, amely tartalmazott 0,5% proteáz inhibitor koktélt is, majd szonikáltuk 10 percig és a sejttörmelékét centrifugálással (16 000 g, 10 perc) távolítottuk el. A centrifugálás után nyert felülúszót használtuk a foszfatáz aktivitás meghatározása és a kölcsönhatási vizsgálatok kivitelezése során.

Western blot analízis

HaCaT sejtek feltárása után a felülúszók fehérjetartalmát BCA reagens felhasználásával mértük meg, amelyhez a lizátumokat tízszeresére hígítottuk desztillált vízzel. Standardként 0,125/0,25/0,5/1,0 mg/ml koncentrációjú BSA-t (marha szérum albumin),

kontrollként pedig desztillált vízben tízszeresére hígított lízispuffert használtunk. Az oldatokat 30 perces 50 °C-on történő inkubálás után ELISA Reader (Labsystems Multiscan) segítségével 540 nm hullámhosszon fotometráltuk. Az abszorbancia adatokat Microsoft Office Excel szoftverrel értékeltük ki lineáris regressziót alkalmazva és határoztuk meg a fehérjekoncentráció értékeit. A mintákat 5-szörös SDS-mintapufferben (60 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerín, 5% β -merkaptoetanol, 0,01% brómfenol kék festék) 10 percig forraltuk.

A lizátumok esetében általában 30 μ g (foszfofehérjék detektálása esetén 50 μ g) fehérjét vittünk fel a géltre, amelyeket SDS-PAGE módszerrel választottunk el Laemmli (Laemmli, 1970) módszerét alkalmazva 10%-os akrilamidot tartalmazó gélen Bio-Rad MiniProtean készülékkel. Az elektroforézist 120 V feszültségen, ~90 percig végeztük, amíg a mintapufferben lévő festékanyag el nem érte a gél alsó peremét. A géleket nitrocellulóz membránra blotoltuk Bio-Rad transzfer egységgel (100 V, 90 perc) a transzferpuffer folyamatos hűtése mellett. A membránok blokkolásához 3 m/v %-os BSA oldatot használtunk, amelyet TBST-ben (0,05% Tween 20-at tartalmazó TBS) oldottunk. Az első és második antitestet is TBST pufferben hígítottuk. A blokkolást követően a membránokat mostuk és az elsődleges antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on, majd újabb mosást követően két órán keresztül HRP-konjugált második antitest oldatával szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az immunreakciókat nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló reagenssel (ECL) detektáltuk.

Dot blot analízis

A foszfatáz kölcsönható fehérjék izolálása során nyert mintákat a készülék közvetlenül nitrocellulóz membránra cseppentette, amelyeket száradás után 3 m/v %-os BSA oldattal blokkoltunk és a Western blothoz hasonló hígításban inkubáltuk az első és második antitestek oldatával és a kapott jeleket ECL reagenssel detektáltuk.

Protein foszfatáz aktivitás mérése

A foszfatáz aktivitás meghatározását nyúl vázizomból tisztított natív PP1c-vel és PP2Ac-vel, rekombináns PP1c-vel, vagy hígított (6-15-szörös véghígítású mintából) B50, H9C2, HepG2 és HaCaT sejtek lizátumából 30 °C hőmérsékleten végeztük 1 μ M 32 P-vel radioaktívan jelzett pulyka zúzából preparált miozin könnyűlánc (32 P-MLC20) szubsztrátot használva. A tisztított foszfatázokat 0,1% 2-merkaptoetanol tartalmazó 20 mM Tris-Cl (pH=7,4) pufferben hígítottuk, majd a különböző tanninokkal 10 percig inkubáltuk. A B50,

H9C2 és HepG2 sejteket mérés előtt 60 percig inkubáltuk OA, TM, MC-LR, CA, EGCG és CsA három különböző koncentrációjú oldatával, a HaCaT sejteket pedig 10 J/cm² UVA fénnel sugároztuk be. A sejtlyázumokat 0,1% BSA-t és 0,1% 2-merkaptoetanolt tartalmazó 20 mM Tris-Cl (pH=7,4) pufferben hígítottuk. A tisztított foszfatázok esetén 10 perc, sejtlyázumok esetén 1-2 perc inkubációs időt alkalmaztunk. A reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítottuk, majd az inkubációs idő letelte után 200 µl 10%-os TCA és 200 µl 6 mg/ml BSA oldat hozzáadásával állítottuk le. A szubsztrátból felszabaduló ³²Pi-t a fehérjék triklórecetsavval történő kicsapását és centrifugálást (8000 g, 1 perc) követően a felülúszóból (370 µl) határoztuk meg. A foszfatáz aktivitás változását a kontroll, kezeletlen mintákhoz (100%) hasonlítva százalékosan adtuk meg.

siRNS transzfekció

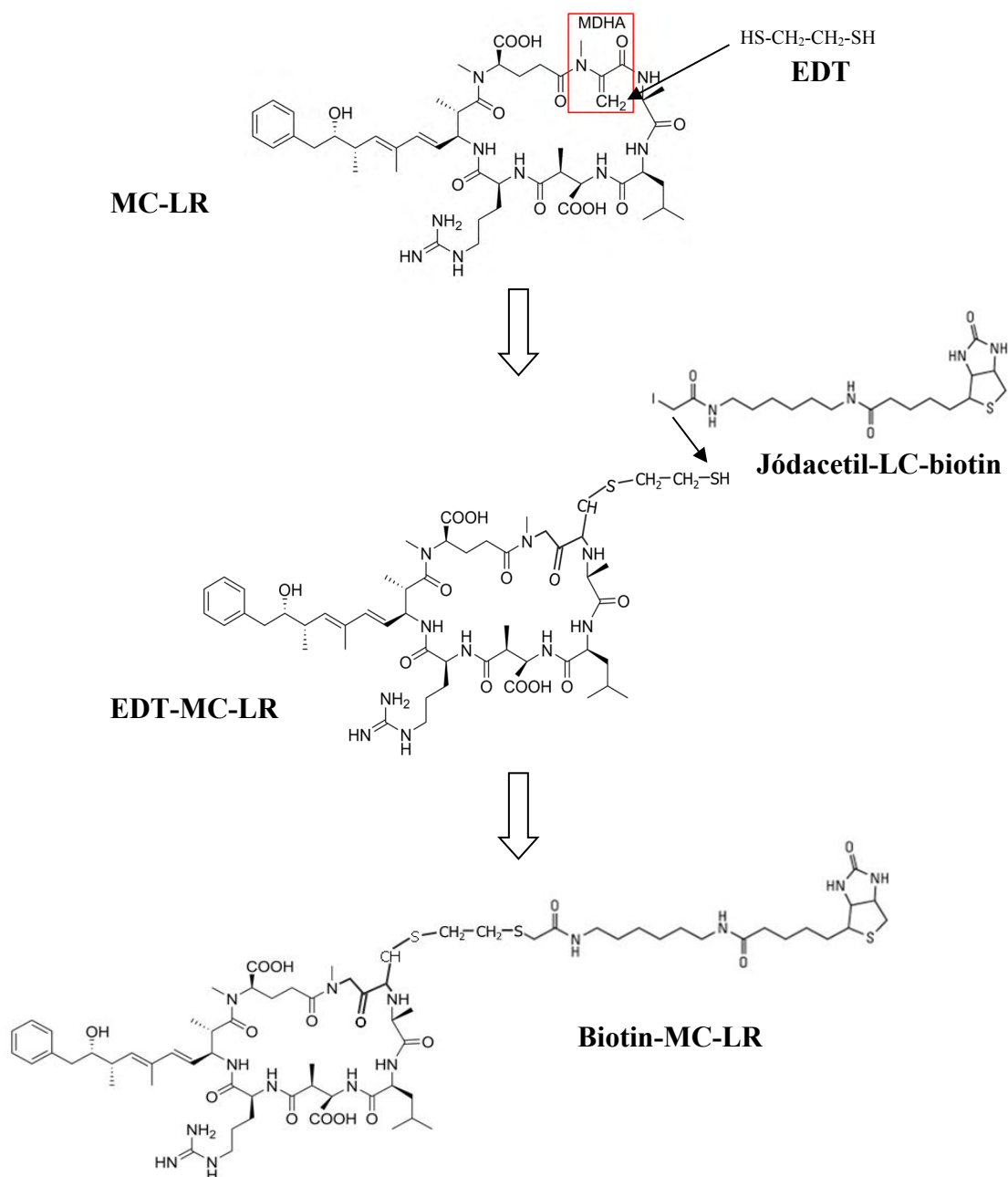
HaCaT sejtekben a PP1c-t panPP1 siRNS-el csendesítettük, amelyet a DharmaFECT 2 transzfekciós reagenst tartalmazó szérummentes DMEM tápoldatban oldottunk. Az siRNS-t lassan hozzácepegettük a transzfekciós reagenshez, az oldatot 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd a HaCaT sejtuszuspenzióhoz adtuk 100 nM siRNS végkoncentrációban és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejteket sejttenyésztő edénybe szélesztettük és hozzáadtunk azonos mennyiségű 20% FBS-t tartalmazó DMEM tápoldatot és 48 órára az inkubátorba tettük.

Mikrocisztin-LR biotinilálása

A mikrocisztin-LR N-metildehidroalanin (MDHA) egységének metilén-csoportjához első lépésben etánditiol (EDT) molekulát kapcsoltunk (Moorhead és mtsai., 1994), amelyet jódacetil-LC-biotinnal reagáltattunk (13. ábra).

1,5 mg MC-LR-t 30 µl etanolban oldottunk, amelyet 70 µl H₂O, 20 µl 5 M NaOH, 2 µl 250 mM EDTA, 80 µl DMSO és 5 µl EDT oldatokkal egészítettünk ki. Minden komponenst összemérés előtt nitrogéngázzal alaposan átbuboréktattunk, hogy elkerüljük az összetevők oxidálódását, majd a reakcióközeget egy órára 55 °C hőmérsékletű vízfürdőbe tettük. A reakció lejátszódása után 1 ml 17,4 M jégecetet adtunk a közeghez, amelyet 0,1%-os triklórecetsavat (TCA) és 1 mM tris-(2-carboxietil)foszfín-hidrokloridot (TCEP) tartalmazó oldattal tízszeresére hígítottunk. A reakcióterméket (EDT-MC-LR) C18 Sep-Pak oszlopon tisztítottuk, amelyet használat előtt 0,1%-os TCA-val ekvilibráltunk. A minta felvitelét követően az oszlopot mostuk 0,1%-os TCA, 1 mM TCEP oldattal és a terméket 1 ml tiszta acetonitrillel (MeCN) eluáltuk. A kapott eluátumot centrifugális evaporátorban (SpeedVac)

beszárítottuk, majd 1,0 ml 50 mM borátot (pH 9,2) és 1 mM TCEP-et tartalmazó pufferben oldottuk.



13. ábra A MC-LR biotinilálása

A MC-LR-t első lépésben a MDHA metilén-csoportján keresztül EDT-vel módosítottuk, amelyhez jódacetil-LC-biotint kapcsolunk.

Az etánditiállal módosított mikrocisztint szobahőmérsékleten 90 percig sötétben inkubáltuk 6 mmol jódacetil-LC-biotin/mmol EDT-MC-LR oldattal (Campos és mtsai., 1996). A biotinilált mikrocisztint fordított fázisú preparatív HPLC oszlopon tisztítottuk. Az elválasztáshoz Hewlett-Packard 1090 Series II típusú, diódasoros detektorral (DAD), automatikus mintaadagolóval és ChemStation szoftverrel felszerelt folyadékkromatográfiás

elrendezést használtunk. A mintát acetonitril gradiens elúcióval választottuk el Supelcosil LC8 (szemcseátmérő: 5 μm , oszlopátmérő: 4,6 mm, oszlophossz: 150 mm) oszlopon. A gradiens elúció előtt acetonitril: 0,1% trifluorecetsav vízben= 25:75 arányú eleggyel 1 percig mostuk az oszlopot, majd 25 perc alatt lineáris gradiens elúció történt acetonitril:0,1% TFA= 50:50 eleggyel. Az eluátum biotin-MC-LR tartalmát 238 nm hullámhosszon ellenőriztük (referencia hullámhossz 450 nm). A kapott frakció biotin-MC-LR tartalmát, illetve a termék tisztaságát tömegspektrometriával (MALDI-TOF-MS) vizsgáltuk. A minták elemzéséhez pozitívion módban Bruker Biflex MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmaztunk. A ionizációhoz 337 nm hullámhosszon sugárzó nitrogénlézert használtunk. A mintákat 2,5-dihidroxibenzoészav (DHB) mátrixba vittük fel és hagytuk megszáradni. A spektrumok több (legalább 100) lézerlövés összegzett eredményéből készültek 19 kV gyorsító és 20 kV reflektoron feszültség mellett. A kalibráció 6-8 tagszámú ciklodextrinek $[\text{M}+\text{Na}]^+$ csúcsaira történt (m/z : 995,31, 1157,36 és 1319,41 Da).

Biotin-MC-LR immobilizálása SA típusú szenzor chip felületére

A gyárilag streptavidinnel kovalensen módosított karboximetil dextrán mátrixot tartalmazó szenzor chip felületét a gyártó által megadott módon 50 mM NaOH, 1 M NaCl vizes oldatával aktiváltuk ($3 \times 1\text{min}$, 20 $\mu\text{l/min}$). A biotin-MC-LR-t 10 mM Hepes (pH=7,4), 150 mM NaCl pufferben hígítottuk $\sim 10\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációra és 2 $\mu\text{l/min}$ áramlási sebességgel injektáltuk telítésig az SA chip felületére, amely megközelítőleg 400 RU-val növelte meg a rezonanciajelet az alapvonalhoz képest. Végül a biotin-MC-LR-rel borított felszínt a pufferrel 10 percig mostuk 100 $\mu\text{l/min}$ áramlási sebességgel.

A kötődő komponensek visszanyerése a szenzor chip felületéről az integrált mikrofluid rendszerben (IFC)

Rekombináns PP1 $\text{c}\delta$ -t 1 μM koncentrációban áramoltattunk át három mikrocisztinnel módosított és egy módosítatlan, kontroll felszín felett telítésig történő injektálással (10 perc, 5 $\mu\text{l/min}$), hogy ellenőrizzük a biotin-MC-LR módosított felszín foszfatázkötő kapacitását. A telítési fázis után a felületeket 100 $\mu\text{l/min}$ áramlási sebességgel mostuk ~ 4 percig (MS_WASH command), amíg a rezonanciajel stabilizálódott. Mielőtt visszanyertük a kötődött rPP1 $\text{c}\delta$ -t, a felületet 50 mM NH_4HCO_3 , 2 mM CaCl_2 vizes oldatával, az IFC-t és az automatikus mintaadagolót (kivéve a cellákat) pedig 50 mM NaOH-dal mostuk. Visszanyerés előtt a cellákat megközelítőleg 30 másodpercig levegővel öblítettük, majd 0,5%-os TFA-val 30 másodpercig inkubáltuk (MS_RECOVER command), amíg a felületen kötött rPP1c teljes

mértékben le nem disszociált, majd a mintaadagoló tűvel visszanyert $\sim 2 \mu\text{l}$ térfogatú mintát a készülék közvetlenül nitrocellulóz membránra cseppentette, amelyet dot blot technikával elemeztünk.

További kísérletekben a biotin-MC-LR-rPP1c komplexszel telített felületre a MYPT1 vad típusú (GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴), PP1c-kötő (His-MYPT1¹⁻⁶³³) és nem-kötődő (MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) fragmentumait injektáltuk, a chip felületén képződő komplexeket pedig a fent leírt módon visszanyertük és elemeztük.

A chiphez kötődő fehérjék visszanyerése a külső felületkezelő egységben (Surface prep unit 2)

A Biacore 3000 készülék rendelkezik egy speciális külső felületkezelő egységgel (14. ábra), amelyben egyrészt több mint háromszor nagyobb (16 mm^2) szenzor chip felszín áll rendelkezésre az IFC-ben lévő négy cella felületéhez ($4 \times 1,2 \text{ mm}^2$) képest, ezáltal növelhető a fehérjék mennyisége a visszanyert mintában. Másrészt a sejtlyizátumok tartalmazhatnak olyan alakos elemeket (sejttörmelék), amelyek elszennyezhetik a precíziós mikrofluid rendszert, ami viszont ebben az esetben nem következik be.

Az Spu2 egység használatakor ugyanazokat a beállításokat (áramlási sebesség, injektálási és inkubációs idő) alkalmaztuk, mint az IFC esetén. Normál, PP1c-csendesített, CLA kezelt vagy UVA fénnel besugárzott sejtekből preparált lizátumokat áramoltattunk a biotin-MC-LR-rel borított felszín felett, majd a visszanyert mintákat az előzőekben bemutatott módon nitrocellulóz membránra cseppentve dot blottal elemeztünk.



14. ábra Külső felületkezelő egység (SPu2)

Az ábra jobb oldalán látható a külső felületkezelő egység a szenzor chippel, baloldalon pedig a nitrocellulóz membrán.

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

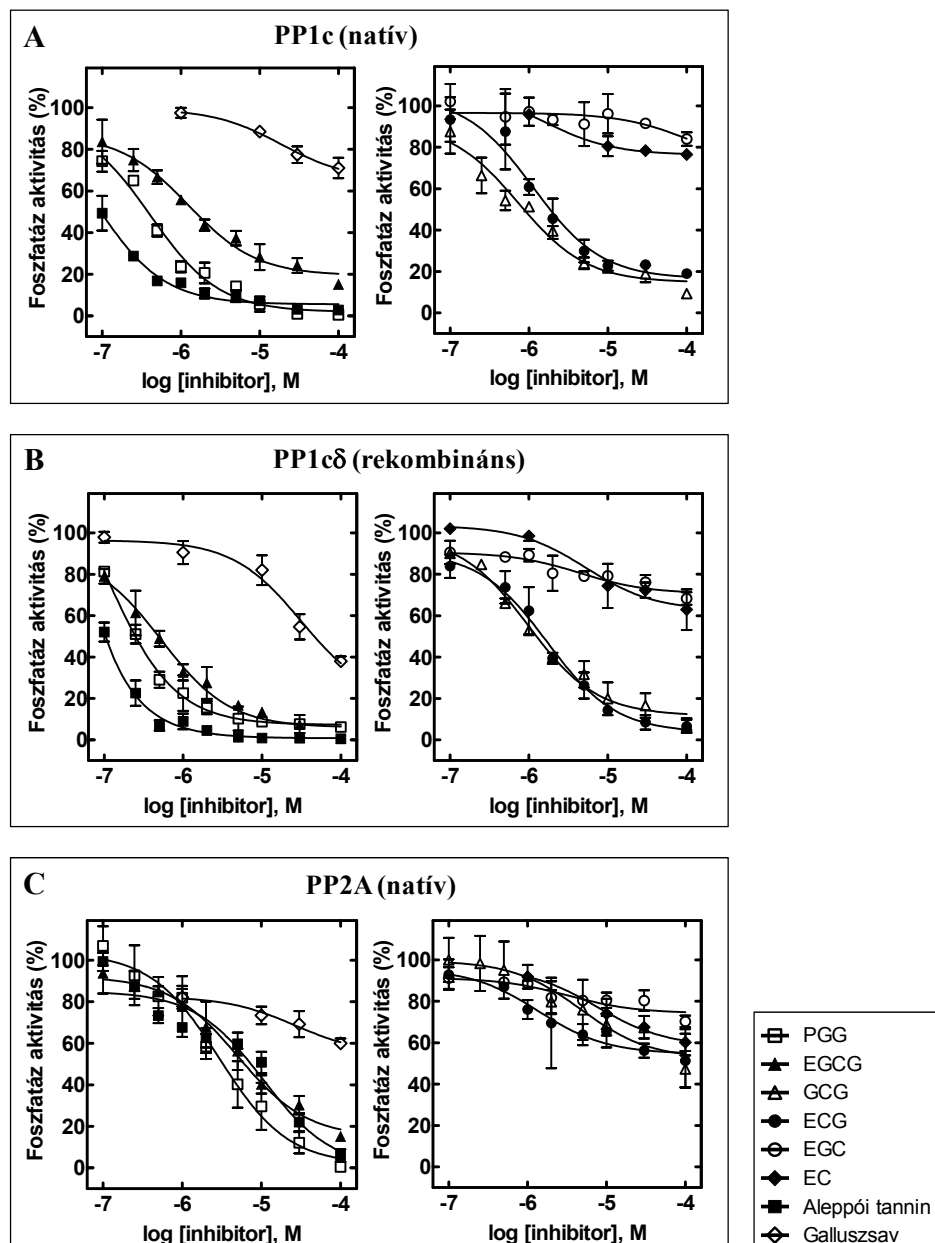
HaCaT sejteket használtunk a lokalizációs kísérletek kivitelezéséhez, amelyeket egy nappal a kísérlet kivitelezése előtt fedőlemezekre szélesztettünk. A sejteket 3,7%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk 10 percig, majd mostuk $3 \times 500 \mu\text{l}$ PBS-sel. A fixált sejteket PBS-ben hígított 0,02 v/v %-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, amelyet újabb PBS-sel ($3 \times$) történő mosás követett. A sejteket blokkoltuk első lépésben BSA oldattal 15 percig, majd 30 percig streptavidin, illetve 30 percig biotin oldattal (a gyártó által megadottak szerint). A fedőlemezeket biotin-MC-LR oldatával szobahőmérsékleten inkubáltuk egy éjszakán keresztül, amelyet 0,1 m/v % BSA/PBS-ben oldatban hígítottunk $\sim 50 \mu\text{M}$ koncentrációra, majd anti-PP1c(E9) vagy anti-PP2Ac antitest 1:100 hígítású (0,1% (m/v) BSA/PBS) oldatával kezeltük egy órán keresztül 4°C hőmérsékleten. A fedőlemezeket 3×10 percig mostuk PBS-sel, majd inkubáltuk 1:200 hígítású Alexa 488 konjugált Streptavidin (zöld) és Alexa 594 konjugált második antitest (piros) oldatával egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A kontroll sejteket csak fluoreszcensen jelzett streptavidinnel és második antitesttel kezeltük hasonlóan az előzőekhez. Végül a fedőlemezeket 3×10 percig mostuk PBS-sel és DNS-hez kötődő festékanyagot (DAPI) tartalmazó ProLong Gold Antifade reagenssel a fedőlemezeket a tárgylemezhez rögzítettük és egy napig fagyasztoóban száradni hagytuk. A sejteket HeNe 543, KrAr 488/568 és Ar 351/364 (UV) lézerdetektorral felszerelt Zeiss LSM 510 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk olajimmerziós (Plan-Neofluar $40 \times / 1.3$ oil DIC) lencsével. A pinhole apertúrák beállítása 80-110 nm-es optikai szeleteket eredményezett. A digitalizált képeket LSM 5 Image Examiner (Carl Zeiss) szoftverrel készítettük, az ábrákat Photoshop (Adobe Systems) képanalizáló szoftver segítségével szerkesztettük.

Eredmények

Polifenolok PP1c és PP2Ac gátló hatásának vizsgálata

Tanninok hatása a tisztított PP1c és PP2Ac aktivitására

A tanninok növényi eredetű vízoldható polifenolok, amelyek széleskörű biológiai hatással rendelkeznek.



15. ábra Tanninok hatása a natív és rekombináns PP1cδ, illetve a PP2Ac enzimek aktivitására

PP1c-t (A), PP1cδ-t (B) és PP2Ac-t (C) az Aleppói tannin (■), PGG (□), EGCG (▲), GCG (Δ), ECG (●), EGC (○), EC (◆) vagy galluszsav (◇) 0-100 μM koncentrációjú oldatával 10 percig inkubáltuk 30 °C-on, majd 1 μM ³²P-MLC20 szubsztráttal mértük a foszfátáz aktivitást. Az eredményeket a tanninok távollétében kapott foszfátáz aktivitás (100%) százalékában adtuk meg.

Számos sejtfolyamat szabályozásában játszanak szerepet; egyes képviselőik foszfatázgátló hatását korábban már igazolták (Erdelyi és mtsai., 2005; Qin és mtsai., 2008), típusspecifikus hatásukat azonban még nem tanulmányozták. Ezen irodalmi adatok alapján megvizsgáltuk a különböző tanninok gátló hatását a tisztított natív és rekombináns PP1c, valamint a PP2Ac enzimek aktivitására.

Az 15. ábrán megfigyelhető, hogy a PGG a natív és rekombináns PP1c δ enzimekre kifejtett gátló hatása az 50%-os gátlást előidéző koncentráció (IC_{50} = 0,4 és 0,26 μ M) meghatározás alapján hasonló, míg a PP2Ac-re jelentősen kisebb (IC_{50} = 6,6 μ M). Az egy nagyságrendnyi különbség a gátlási állandókban lehetővé teszi a PP1c részlegesen szelektív gátlását, így a PP1c és a PP2Ac aktivitások megkülönböztetését *in vitro*. Mivel a PGG képes a kétértékű fémionokkal komplexet alkotni, ezért megvizsgáltuk, hogy a gátló hatása nem azáltal valósul-e meg, hogy elvonja a PP1c aktív centrumában található fémionokat. Ezért az aktivitásméréseket megismételtük 1 mM $MnCl_2$ jelenlétében is (nincs dokumentálva), de jelentős eltérést a gátlás hatékonyságában nem tapasztaltunk (IC_{50} = 0,8 μ M), ami arra utal, hogy a PGG gátló hatása nem a PP1c aktív centrumában lévő kétértékű fémionok elvonása révén valósul meg.

Tanulmányoztuk az EGCG és különböző szerkezeti rokon vegyületeinek hatását a fent említett enzimek aktivitására. A foszfatáz gátlásra vonatkozó IC_{50} értékeket a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat A tanninok foszfatázgátlásra kapott IC_{50} értékei (μ M)

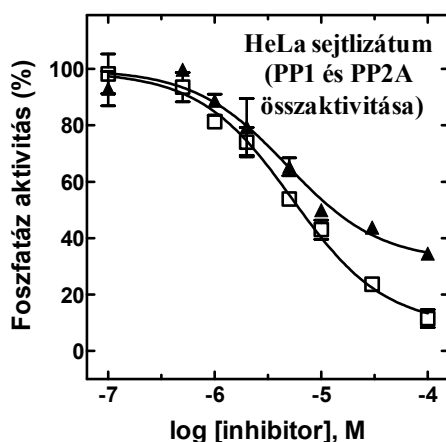
Effektor	PP1c	PP1c δ	PP2Ac
PGG	0,40 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,03	6,60 $\pm$ 1,30
EGCG	1,35 $\pm$ 0,20	0,47 $\pm$ 0,10	15,00 $\pm$ 2,50
GCG	1,10 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,19	> 30
ECG	1,60 $\pm$ 0,18	1,50 $\pm$ 0,20	> 100
EGC	> 100	> 100	> 100
EC	> 100	> 100	> 100
Aleppói tannin	0,10 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02	10,50 $\pm$ 1,70
Galluszsav	> 100	> 30	> 100

A GCG molekula konfigurációjában, az ECG pedig egy hidroxil-csoportban tér el az EGCG-től. Az EGCG, GCG és ECG hasonló mértékben gátolja a PP1c-t, míg a PP2Ac esetében a gátlás a két szerkezeti variáns esetén jelentősen kisebb az EGCG-hez képest. Az EGC egy galloil-csoporttal, az EC további egy hidroxil-csoporttal tér el az EGCG-től, ezen szerkezeti

differentenciák a foszfatáz aktivitás gátlás jelentős csökkenését okozzák ($IC_{50} > 100 \mu M$). Vizsgáltuk az Aleppói tannin (természetes tanninkeverék) és a tanninok egyik szerkezeti egységének, a galluszsavnak a foszfatázgátló hatását is. Az Aleppói tannin sokkal nagyobb mértékben csökkentette a PP1c és a rPP1c δ aktivitását, mint bármelyik más tannin. A PP1c-re és PP2Ac-re kifejtett gátló hatása között 100-szoros különbség figyelhető meg, ami az Aleppói tannin jelentős PP1c szelektivitását mutatja. A galluszsav önmagában csak kismértékű foszfatázgátlást okozott ($IC_{50} > 30\text{-}100 \mu M$).

A fenti eredmények arra utalnak, hogy főként a galloil-csoport, de kisebb mértékben a polifenolgyűrű és annak hidroxil-csoportjai is hatással vannak a foszfatáz aktivitásra.

HeLa sejtizátumban vizsgáltuk az EGCG és a PGG hatását a foszfatáz aktivitásra, amelynek eredménye a 16. ábrán látható. A koncentráció növekedésével jelentős aktivitás csökkenés figyelhető meg, az IC_{50} érték PGG esetén $6,2 \mu M$, míg EGCG esetén $10 \mu M$ volt. Az eredmények arra utalnak, hogy a PGG és az EGCG nemcsak önmagában a tisztított katalitikus alegységet, hanem a holoenzimet is képes gátolni egyéb celluláris fehérjék jelenlétében is.



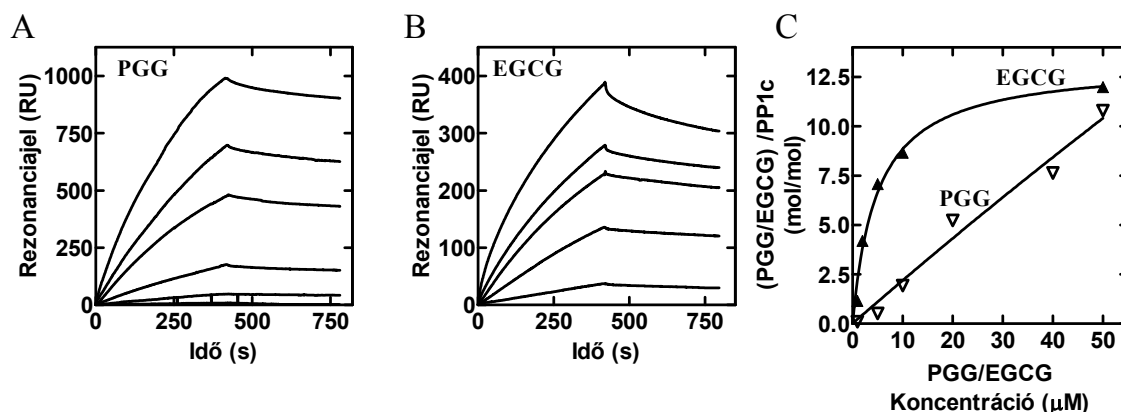
16. ábra PGG és EGCG hatása a foszfatáz aktivitásra HeLa sejtek liátumában

HeLa sejtek lizátumában vizsgáltuk $1\text{-}100 \mu M$ koncentrációjú PGG ($\square$) és EGCG ($\blacktriangle$) hatását a foszfatáz aktivitásra, amelyet $1 \mu M$ ^{32}P -MLC20 szubsztráttal 10 percig mértünk $30^\circ C$ -on.

PP1c δ kölcsönhatásának vizsgálata PGG és EGCG tanninokkal Biacore kötődési technikával

A PP1c δ és két tannin, a PGG és az EGCG közötti kölcsönhatást SPR elvén alapuló mérési technikával is igazoltuk. A rekombináns PP1c δ -t amino-csoporton keresztül immobilizáltuk CM5 típusú szenzor chip felületére. A PGG és az EGCG ($1\text{-}50 \mu M$) különböző koncentrációjú oldatát áramoltatva a felület felett mértük a rezonanciajel változását, amelyet a 17. ábra A és B része szemléltet. A kölcsönhatásukra minden esetben

jellemző volt a lassú asszociációs és disszociációs szakasz. Az asszociációs egyensúlyi állandó (PP1c-PGG) (K_A) $2,2 \pm 1,1 \times 10^5$ M-nek és (PP1c-EGCG) $1,4 \pm 0,6 \times 10^6$ M-nak adódott. A kapott egyensúlyi állandók látszólagosnak tekinthetők, mivel az adatok kiértékelésénél 1:1 Lagmuir modellt alkalmaztunk, viszont a rezonanciajel-változásokból számított kötődési arány a magasabb tanninkoncentrációk esetében 1:11-12 (17. ábra C része). Ez egyrészt utalhat arra, hogy az enzim felületén több tanninkötő hely található, másrészt a kötődött tanninmolekulák képesek egymással is kölcsönhatásba lépni („stacking”), ezáltal növelve a kölcsönható molekulák arányát (Wroblewski és mtsai., 2001).



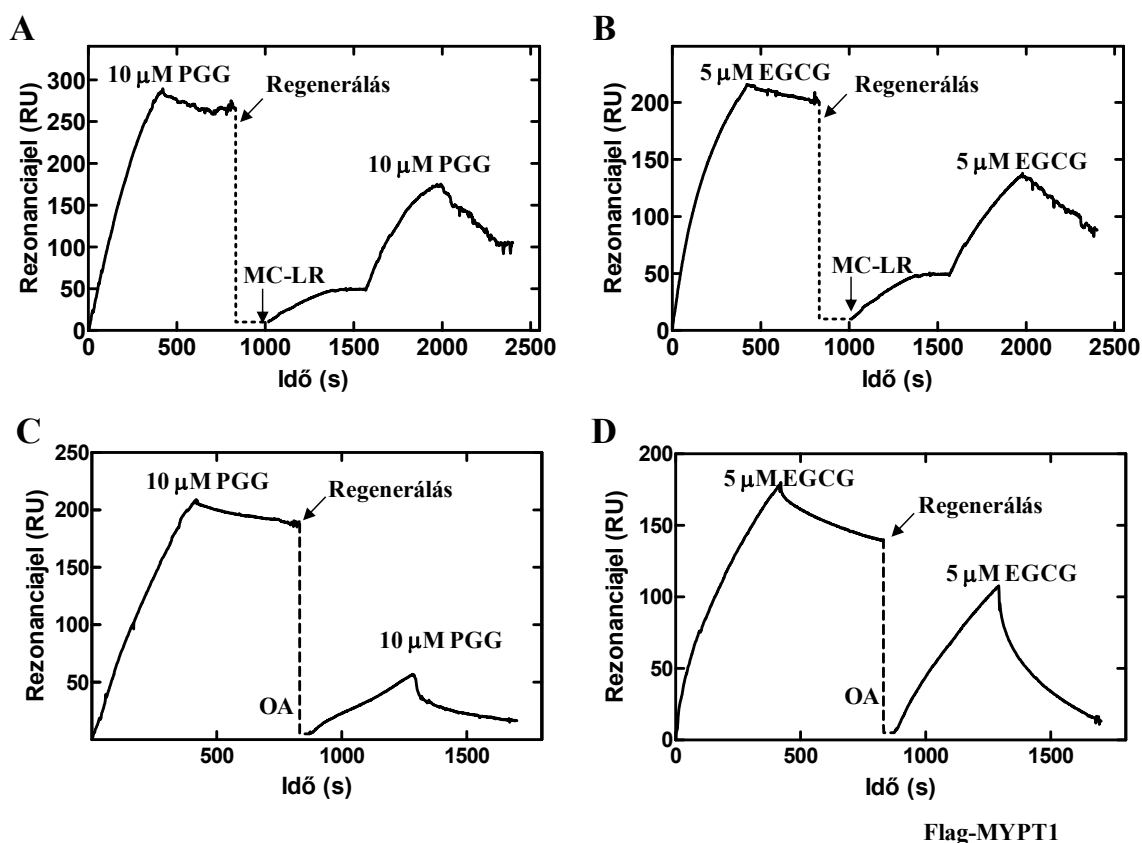
17. ábra PGG és EGCG rekombináns PP1c δ -val való kölcsönhatásának vizsgálata SPR alapú módszerrel

rPP1c δ -t immobilizáltuk szenzor chip CM5 felületére, majd 1-50 μ M koncentrációtartományban PGG (A) és EGCG (B) oldatát áramoltattuk a felület felett és mértük a rezonanciajel változását. (C) A PGG és EGCG különböző koncentrációkban rPP1c-hez kötődött mol/mol arányát mutatja.

PGG és EGCG foszfatázgátló mechanizmusának vizsgálata

Korábban vizsgáltuk a PGG és az α -amiláz között kialakuló kölcsönhatást, amely szerint a PGG a hidrofób aromás gyűrűjén keresztül lép kölcsönhatásba az enzimmel (Gyemant és mtsai., 2009). Ezért feltételeztük, hogy a tanninok és a PP1c között kialakuló kölcsönhatás is hidrofób jellegű és a PP1c katalitikus centrumában található hidrofób ároknak fontos szerepe lehet a folyamatban. Mivel az enzimnek ezen régiójához kötődik a gátló toxinok többsége is, ezért kompetíciós kísérletet végeztük a feltételezett közös kötőhely igazolására. A rPP1c δ -val borított felület felett 10 μ M PGG vagy 5 μ M EGCG oldatát áramoltattuk, majd regenerálás után az immobilizált rPP1c δ -t telítettük 1 μ M MC-LR vagy 5 μ M OA oldatával és a két tannin kötődését újra megmértük. Mivel az OA reverzibilisen kötődik az enzimhez, ezért telítés után a tanninok oldatát változatlan OA koncentráció mellett, szünet nélkül injektáltuk a felületre, hogy elkerüljük az enzimhez kötődött OA disszociációját.

A 18. ábra szemlélteti, hogy a kölcsönhatás mértéke jelentősen csökken a MC-LR és az OA oldatával való előzetes telítés hatására. A PGG és az EGCG asszociációja az enzimhez lelassult, a kötődés mértéke kisebb volt, a disszociációs sebesség pedig megnövekedett. Mivel mind a MC-LR, mind pedig az OA gátlása a PP1c katalitikus centrumának hidrofób árkával való kölcsönhatáson keresztül valósul meg, ezért a kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a tanninok is az enzim hidrofób régiójával hatnak kölcsön. Mivel azonban a kölcsönhatás mértéke nem csökkent le teljes mértékben, valamint a kötődés kinetikája is változott, feltételezhető, hogy a vizsgált tanninok a hidrofób árok mellett másik régiókhoz is kötődhetnek. Felmerül annak a lehetősége is, hogy a MC-LR és az OA nem telíti teljesen a PP1c kötő felületét, így még marad a PGG vagy az EGCG számára szabad kötőhely.

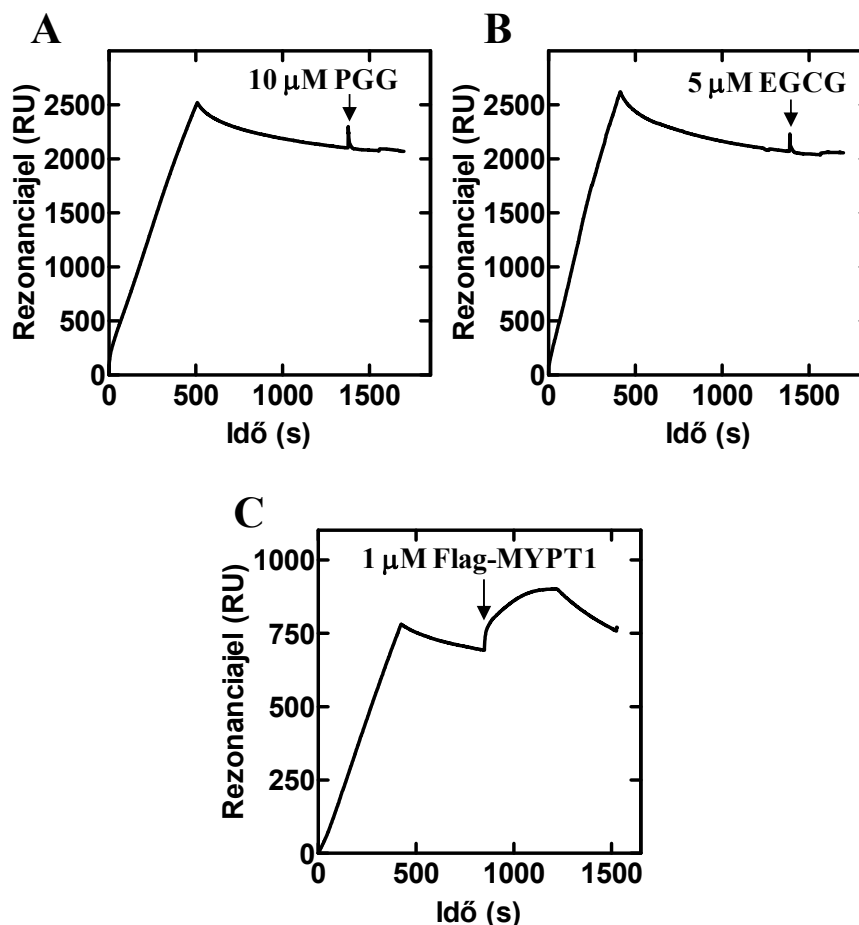


18. ábra A MC-LR vagy az OA, valamint a PGG vagy az EGCG rPP1c δ -hoz való kötődésének vizsgálata kompetíciós kísérletben

A szenzor chip felületén immobilizált PP1c kölcsönhatását vizsgáltuk 10 μ M PGG-vel (A, C) vagy 5 μ M EGCG-vel (B, D) a PP1c előzetes MC-LR-rel (A, B) vagy OA-val (C, D) való telítése nélkül vagy után.

A fenti ellentmondások feloldására a kompetíciós kísérleteket egy másik elrendezésben is megismételtük. A MC-LR-t biotiniláltuk, majd streptavidinnel módosított szenzor chip felületére immobilizáltuk és a rPP1c δ -t injektáltuk a felületre. Ezzel a PP1c

immobilizálási technikával a felületen csak olyan PP1c található, amelynek csak a MC-LR kötőhelye blokkolt.



19. ábra A PGG és az EGCG biotin-MC-LR-rel immobilizált rPP1c-hez való kötődésének vizsgálata

Szenzor chip SA felületét biotinilált MC-LR oldatával telítettük, majd rPP1c oldatát injektáltuk a felület felett, és alapos mosást követően vizsgáltuk a PGG (A) és az EGCG (B) kötődését a felülethez. Kontrollként Flag-MYPT1-et (C) injektáltunk a felületre, amely a MC-LR kötőhelytől eltérő régióhoz kötődik.

A MC-LR-PP1c kölcsönhatása megfelelően erős ahhoz, hogy az enzimet a felületen tartsa, alapos mosást követően csak elhanyagolható mértékű PP1c disszociáció figyelhető meg (19. A és B ábra). A PGG és EGCG injektálása nem okoz jelentős mértékű rezonanciajel-változást, ami azt mutatja, hogy a kölcsönhatás nem jön létre az enzimmel, tehát a PGG és az EGCG kötőfelülete kizárólag a hidrofób árok lehet az enzim szerkezetében. Pozitív kontrollként Flag-MYPT1-et, a PP1c regulátor alegységét injektáltuk a PP1c-MC-LR felületre, amelynek jelentős rezonanciajel változása mutatja a kölcsönhatás kialakulását a regulátor alegységet kötő felülettel (19. C ábra).

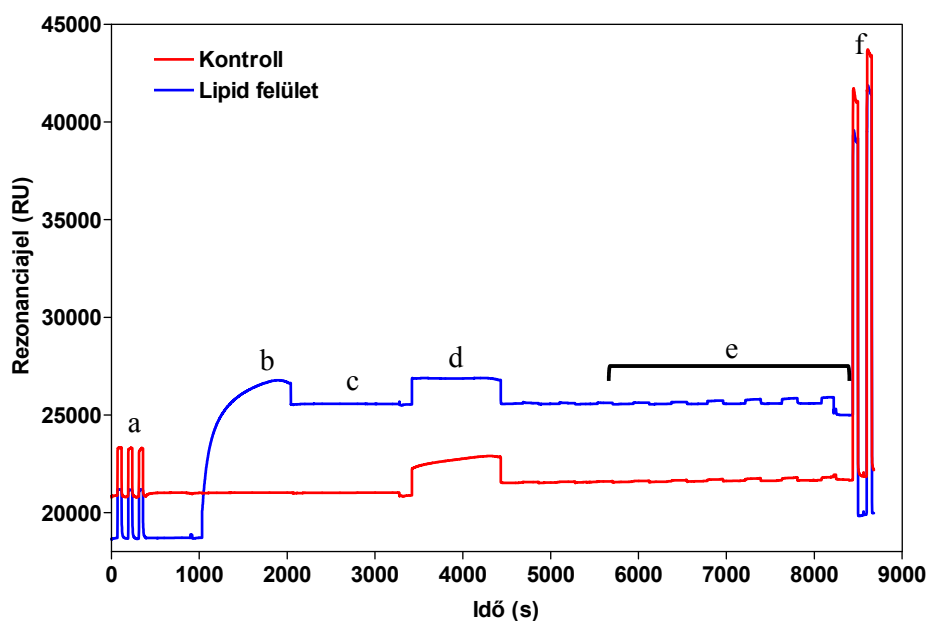
Ezen kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a tanninok a közismert foszfatázgátló toxinokhoz hasonlóan a PP1c katalitikus centrumának hidrofób árkába kötődnek.

Eredményeinket NMR kötődési kísérletek és számítógépes molekulamodellező szimulációk is alátámasztották (Kiss és mtsai., 2013).

Foszfataz inhibitorok gátló mechanizmusának vizsgálata

Foszfataz inhibitorok különböző szöveti eredetű membránokkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálata SPR technikával

A foszfataz inhibitorok gátló mechanizmusának kifejtésében fontos szerepe lehet a sejtmembránnal kialakított kölcsönhatásuknak és diffúziójuknak az intracelluláris térbe. Az inhibitorok és a különböző szöveti eredetű lipidekből preparált micellák interakcióját SPR technikával vizsgáltuk. A méréshez L1 típusú szenzor chipet használtunk, amely hidrofób csoporttal módosított karboximetil dextrans mátrixot tartalmaz. A lipofil molekula beépül a micella szerkezetébe, ezáltal immobilizálja azt a felületen. A kísérletet elvégeztük 20 és 37 °C hőmérsékleten ugyanazon beállítások mellett, a különbség az asszociációs és a disszociációs időkben volt. Mivel fiziológias hőmérsékleten a kölcsönhatás sebessége nagymértékben megnőtt, ezért elegendőnek tartottuk az egy perces injektálást és disszociációt. Az injektálás első néhány másodpercében 37 °C-on az inhibitorok rendkívül gyors kötődése azonnali telítéshez vezetett.

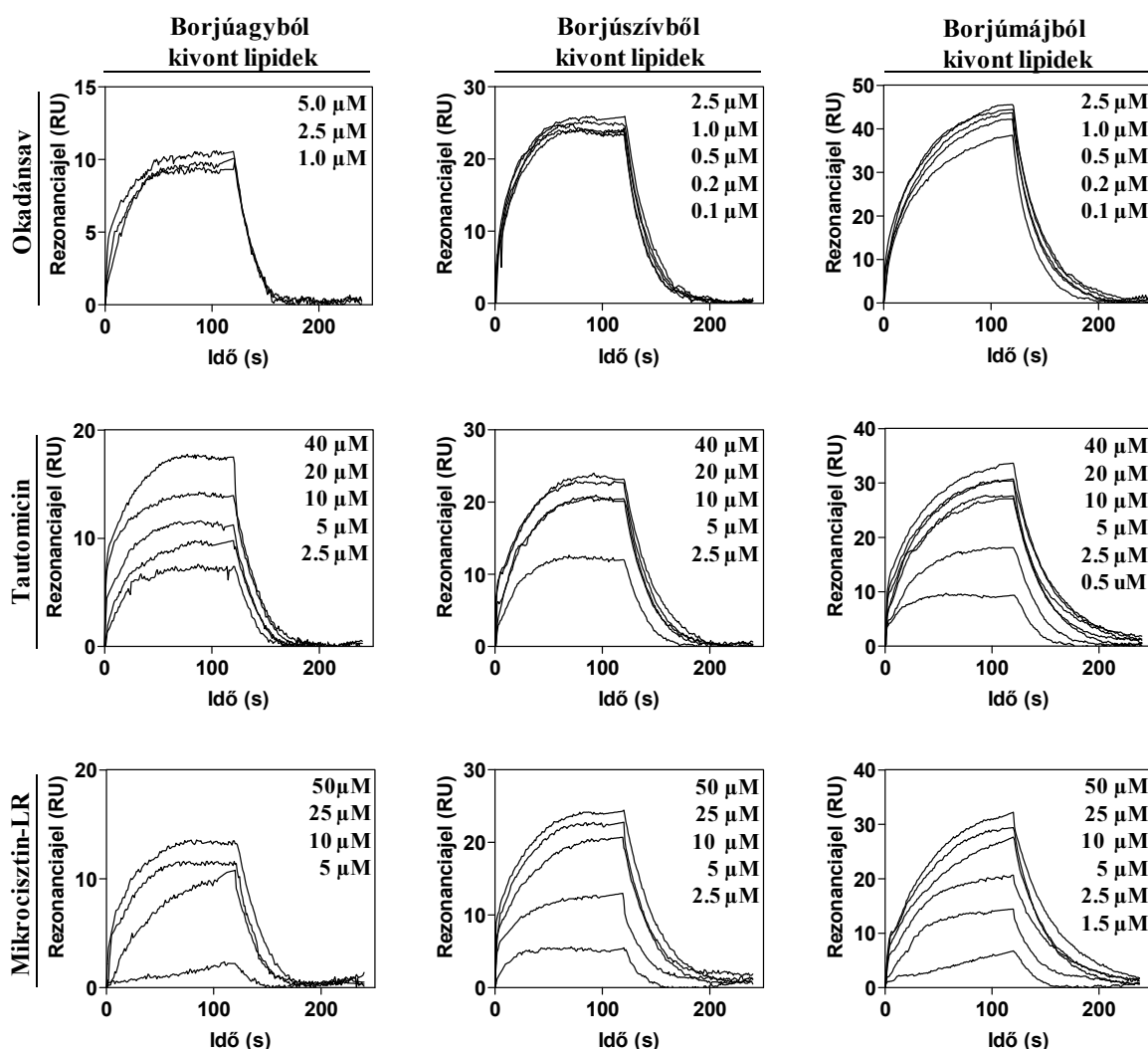


20. ábra Lipid micellák immobilizálása L1 szenzor chip felületére, majd kölcsönhatásuk vizsgálata a különböző foszfataz inhibitorokkal

A chip felületét mostuk 3×1 percig 20 mM Chaps oldatával 20 µl/min áramlási sebességgel (a), a különböző szöveti eredetű micellák oldatát telítésig injektáltuk (b), majd mosás (c) és BSA-val való blokkolás (d) után a foszfataz inhibitorok különböző koncentrációjú oldatát injektáltuk a felületre (e), amelyet regenerálás követett (f).

Az SPR vizsgálat lépéseit a 20. ábra szemlélteti. A lipid micellákat minden esetben telítésig injektáltuk az L1 szenzor chip felületére, amely 7500 ± 200 RU immobilizációs szintet jelentett. Mivel a kölcsönhatások rezonanciajel-változásai néhány 10 RU tartományba esnek, ezért ezek a változások csak részben láthatóak az ábrán.

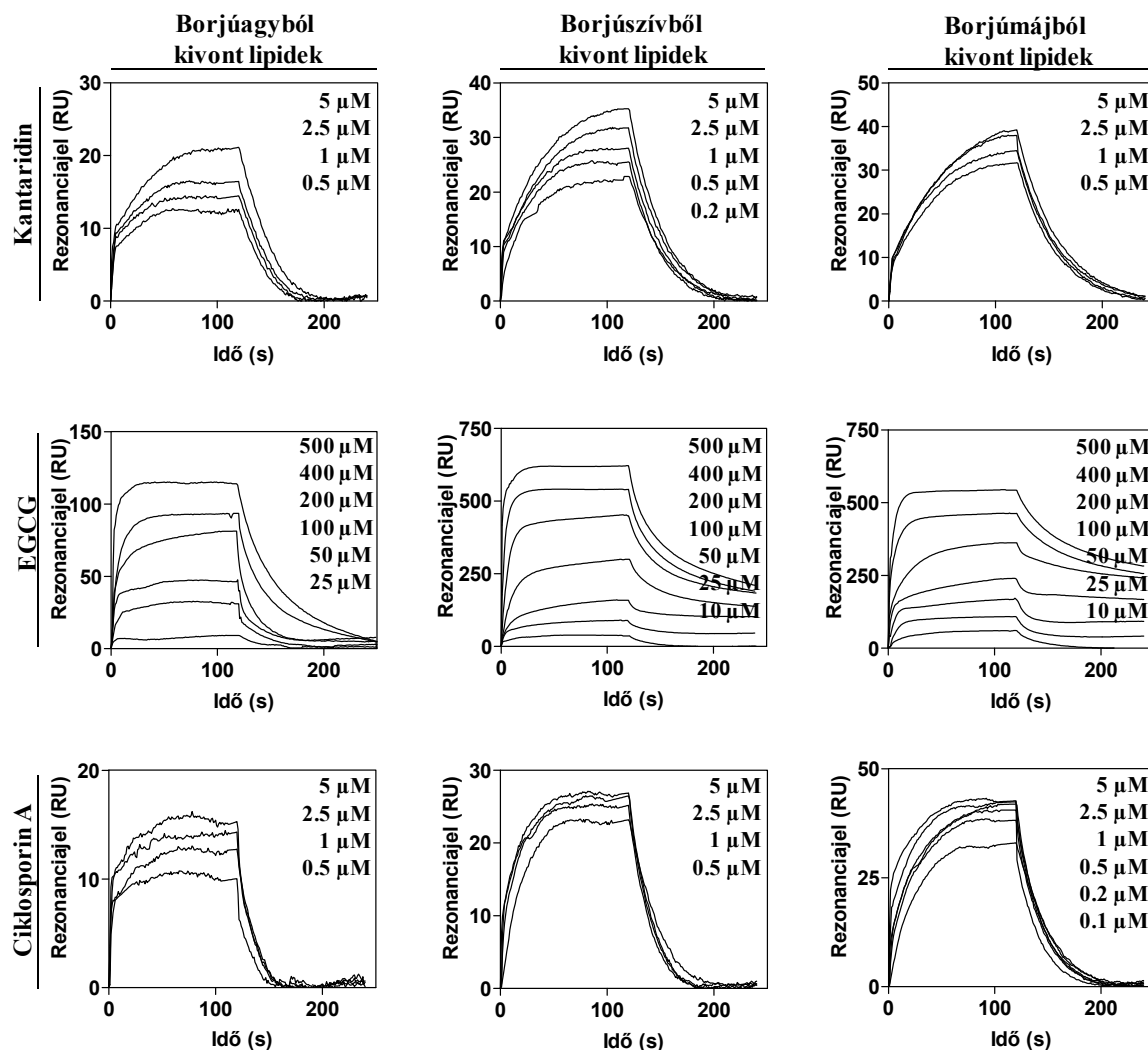
A 21. ábrán a klasszikus foszfatáz inhibitorok különböző összetételű lipid micellákkal kialakított kölcsönhatásai láthatóak. Az OA esetében nem, a TM és a MC-LR esetében viszont megfigyelhető a kötődés koncentrációfüggése a vizsgált koncentráció-tartományban.



21. ábra A klasszikus foszfatáz inhibitorok kötődésének vizsgálata 20 °C-on a különböző szöveti eredetű lipid micellákhoz

Borjú agy, szív és májszövetből izolált lipidekből preparált micellákat immobilizáltunk szenzor chip L1 felületére, majd a kontroll és lipid immobilizált felületeket 0,1 mg/ml BSA oldattal blokkoltuk és a különböző koncentrációjú OA (felső sor), TM (középső sor) és MC-LR (alsó sor) kötődését vizsgáltuk. Az asszociációt és a disszociációt 120 s-ig detektáltuk.

A 22. ábrán látható a CA, az EGCG és a CsA inhibitorok kötődése a lipid micellákhoz, amelyek a PP2A (Li és mtsai., 1992), a PP1 (Kiss és mtsai., 2013), illetve a PP2B (Rusnak és mtsai., 2000) hatékony gátlószerei.



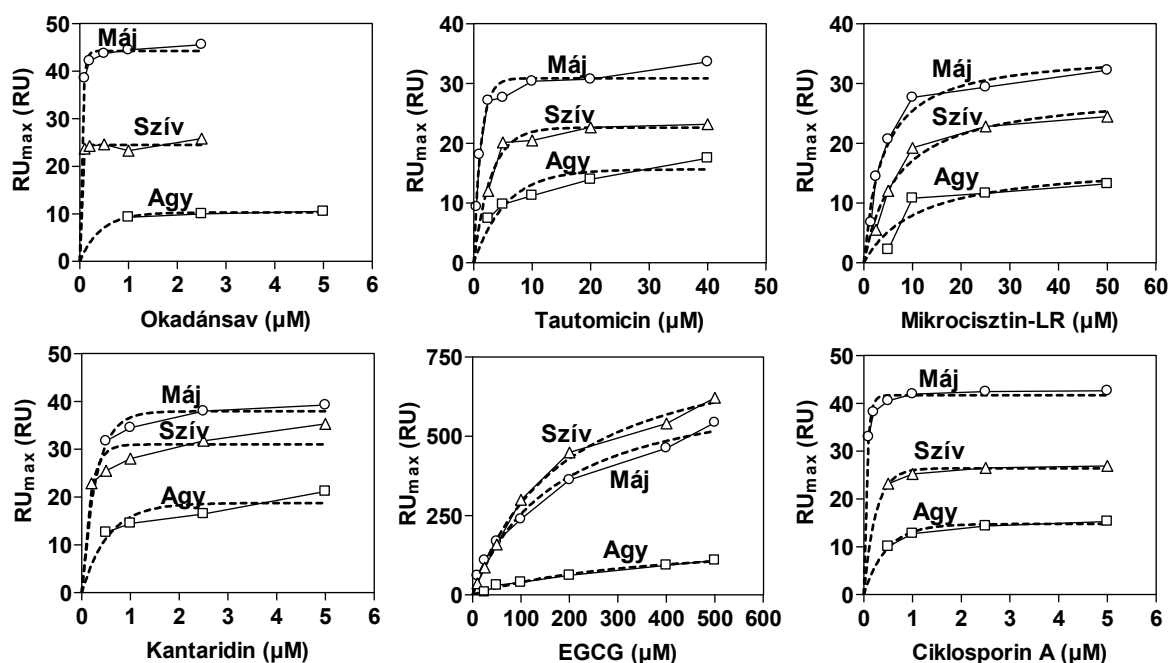
22. ábra PP1c, PP2A és PP2B inhibitorok (CA, EGCG és CsA) kötődésének vizsgálata L1 chip felületén immobilizált lipid micellákhoz 20 °C-on

A CA (felső sor), az EGCG (középső sor) és a CsA (alsó sor) kötődését vizsgáltuk különböző lipidösszetételű micellákhoz a 20. ábrán leírtak szerint.

A CA és a CsA csak kismértékű, míg az EGCG a teljes vizsgált tartományban jelentős koncentrációfüggést mutat. A kapott szenzorgarmok az inhibitorok tranziens kötődését mutatják a lipid micellákkal, amely kölcsönhatások az EGCG kivételével reverzibilisek. Az EGCG disszociációja nem minden koncentráció esetén teljes, amelynek lehetséges oka a tanninok önasszociációra („stacking”) való hajlama (Wroblewski és mtsai., 2001; Kiss és mtsai., 2013), miáltal nehezen távolíthatóak el a felületről.

A kapott rezonanciajel maximumokat az alkalmazott inhibitor koncentráció függvényében ábrázoltuk (23. ábra). Az 23. ábrán látható a kölcsönhatások viszonylagos

szövetspecifitása, miszerint a foszfatázgátló toxinok legkevésbé az agyból kivont lipidekhez kötődnek, míg a legnagyobb mértékű kötődés a májból kivont lipidekkel figyelhető meg. Az EGCG esetén a szív és máj lipidekkel való kölcsönhatás megközelítőleg azonos mértékű.



23. ábra Foszfatáz inhibitorok lipid micellákhoz való kötődésének koncentrációfüggése és szövetspecifitása

A kapott rezonanciajel maximumokat ábrázoltuk az inhibitor koncentrációk függvényében (folytonos vonal). A pontozott vonal a nemlineáris illesztéssel kapott görbét mutatja.

A kapott görbékől nemlineáris illesztéssel látszólagos disszociációs egyensúlyi állandót ($K_{D(app)}$) határoztunk meg, amelyet a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat Látszólagos disszociációs egyensúlyi állandók ($K_{D(app)}$)

	$K_{D(app)}, \mu M$		
	Agyból kivont lipid	Szívből kivont lipid	Májból kivont lipid
Okadánsav	n.d.	n.d.	$0,03 \pm 0,01$
Tautomycin	$3,82 \pm 0,71$	$2,04 \pm 0,13$	$0,86 \pm 0,04$
Mikrocisztin-LR	$7,33 \pm 1,50$	$5,11 \pm 0,51$	$3,16 \pm 0,05$
Kantaridin	$0,37 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,03$
EGCG	$185,2 \pm 16,25$	$111,8 \pm 5,25$	$110,2 \pm 19,20$
Ciklosporin A	n.d.	n.d.	$0,05 \pm 0,01$

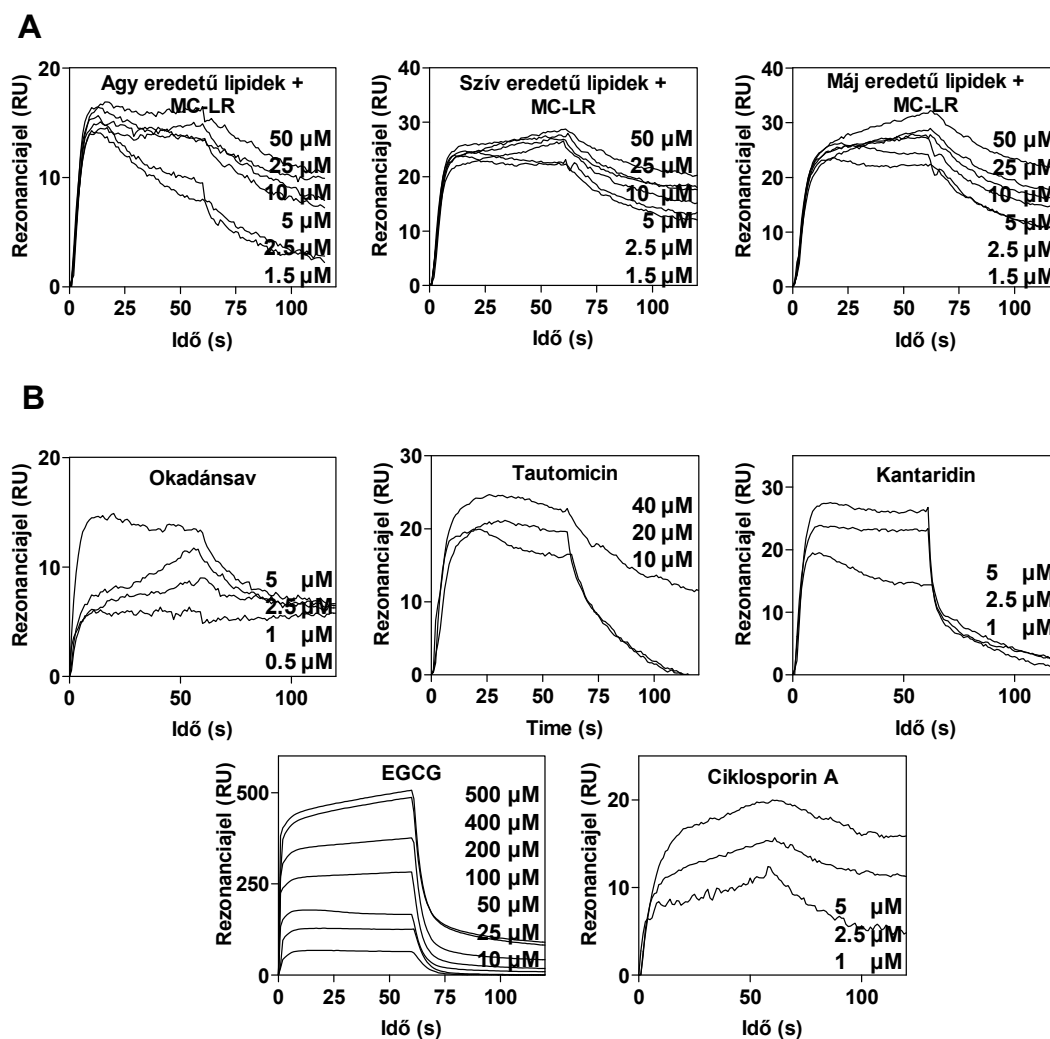
n.d. nem meghatározható

Megfigyelhető, hogy nincs nagyságrendi különbség az inhibitorok különböző összetételű membránlipidekkel való kölcsönhatását jellemző disszociációs állandókban. A legnagyobb, alig ötszörös különbség a TM kötődésében figyelhető meg.

Az eredmények arra is utalnak, hogy a különböző eredetű lipid micellák inhibitorkötő kapacitása eltérő, ami viszont jelentősen befolyásolhatja a gátlás kinetikáját.

A fenti kísérletekhez hasonló lipidasszociációs vizsgálatokat eddig általában 20 °C-on végezték (Abdiche és mtsai., 2004; Cho és mtsai., 2004; Besenicar és mtsai., 2006). Felvetődik azonban annak a lehetősége, hogy a kölcsönhatások jellege fiziológias hőmérsékleten (37 °C) eltérő a lipid micellák állapotváltozása, valamint az asszociáció-disszociáció kinetikájának változása következtében. A lipidek immobilizációja 37 °C-on hasonló mértékű volt, mint 20 °C-on, viszont a felület stabilitása csökkent, az immobilizációt követő 30 perces mosási szakaszban a lipid micellák közel 5%-a disszociált a szenzor chip felületéről. A felület viszonylagos instabilitásából adódóan a kapott szenzorgramok „zajosabbak”, az inhibitorok asszociációjának mértéke közel felére csökkent és jelentősen növekedett az asszociáció sebessége. Az injektálást követő néhány másodpercben az inhibitorok kötődése telítést ért el és a koncentrációfüggés csaknem megszűnt. A 24. ábra A része mutatja a MC-LR kölcsönhatását a különböző eredetű lipid micellákkal, amelyben a gyors asszociációt lassú disszociációs szakasz követ. A görbékből jól kitűnik, hogy a kölcsönhatás reverzibilitása jelentősen csökkent, a toxinok csak részlegesen disszociáltak a micellák felületéről. A felület viszonylagos instabilitását jól szemlélteti, hogy már az asszociációs szakaszban is látható a rezonanciajel csökkenése. A 24. ábra B része mutatja a vizsgált inhibitorok asszociációját a máj eredetű lipidekkel. Az OA, TM és a CsA hasonló kötődési profilt mutatott, mint a MC-LR, míg a CA és az EGCG kötődési mechanizmusa alig tér el a 20 °C-on mérttől.

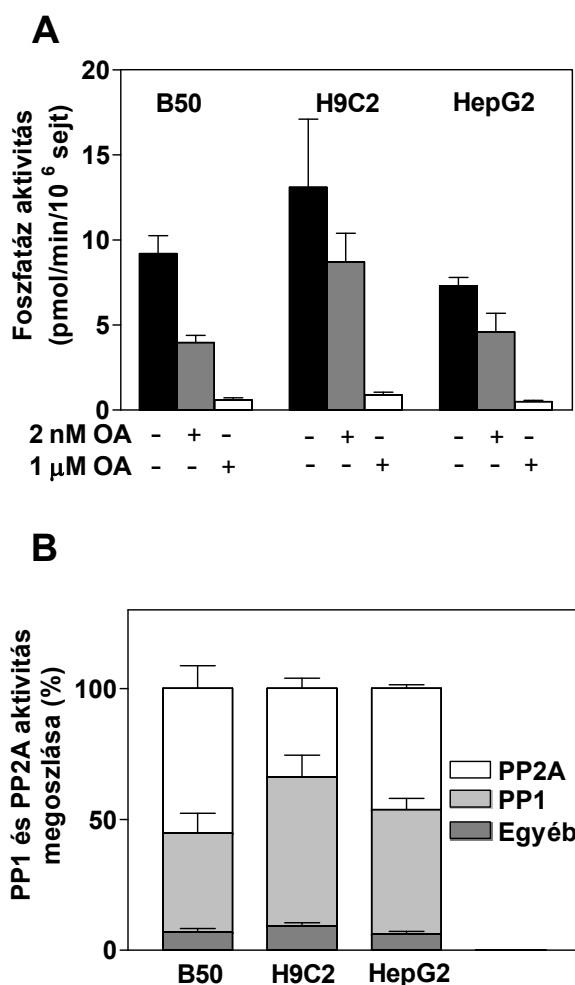
Eredményeink alapján megállapítható, hogy egyes inhibitorok kölcsönhatása a lipid micellákkal magasabb hőmérsékleten megváltozik, a MC-LR, OA, TM és a CsA részben bejuthatnak a micellák belsejébe, ahol visszatartódhatnak. Ez arra utalhat, hogy a foszfatázgátló toxinok disszociációja az intracelluláris oldalon lassul.



24. ábra Foszfataz inhibitorok lipid micellákhoz történő kötődésének vizsgálata 37 °C-on (A) A MC-LR agy, szív és máj eredetű lipid micellákhoz való kötődése. (B) Az OA, TM, CA, EGCG és a CsA máj eredetű lipid micellákkal való kölcsönhatásai. A kísérleteket a 20. ábrán leírtak szerinti beállítással végeztük 37 °C hőmérsékleten és 60 s injektálási idővel.

PP1 és PP2A eloszlása B50, H9C2 és HepG2 sejtekben

Tanulmányozni kívántuk, hogy az inhibitorok eltérő szöveti eredetű lipidekkel való különböző kölcsönhatásai tükröződnek-e eltérő sejtvonalakra kifejtett foszfataz gátlásban. Először vizsgáltuk a PP1 és PP2A megoszlását B50, H9C2 és HepG2 sejtekben ^{32}P -MLC20 szubsztrát segítségével azonos sejtszámú mintában. Hígított sejtlizátumhoz 2 nM OA-at adtunk, amely a PP2A aktivitását teljes mértékben gátolja, elhatárolva a PP1 aktivitástól, majd 1 µM OA-val gátoltuk a hígított lizátumban a PP1 és PP2A együttes aktivitását. A teljes foszfataz aktivitást 10^6 sejtre vonatkoztattuk. A 25. ábra A diagram szemlélteti, hogy a teljes foszfataz aktivitás a H9C2 sejtekben a legnagyobb, amelyet a B50 sejtek követnek, a legkisebb aktivitás pedig a HepG2 esetén figyelhető meg.



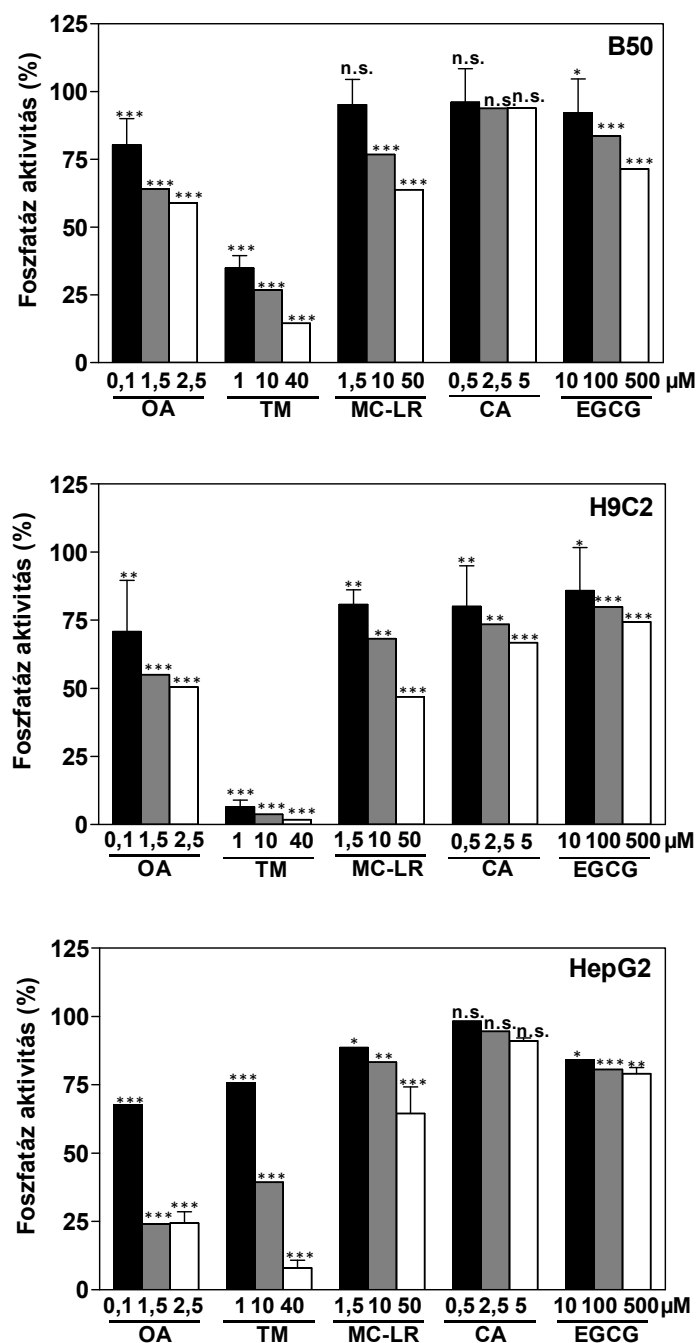
25. ábra Teljes foszfatáz aktivitás (A) és PP1/PP2A aktivitás megoszlása (B) B50, H9C2 és HepG2 sejtekben

(A) A teljes foszfatáz aktivitást B50, H9C2 és HepG2 sejtekben inhibitorok nélkül, valamint 2 nM és 1 μ M OA mellett határoztuk meg, amelyet 10^6 sejt számra vonatkoztattunk. (B) A PP1 és PP2A aktivitás százalékos eloszlása a vizsgált sejt vonalakban.

A 25. ábra B része a PP1 és PP2A aktivitás százalékos eloszlását mutatja. Látható, hogy a PP1 aktivitása a H9C2, míg a PP2A aktivitása a B50 sejtekben a magasabb. Minden sejt vonal esetében megfigyelhetünk PP1/PP2A független foszfatáz aktivitást, amelyet az 1 μ M OA hatására fennmaradó aktivitás mutat, ez azonban minden esetben kevesebb, mint 10 %.

Inhibitorok hatása a B50, H9C2 és HepG2 sejtek foszfatáz aktivitására

³²P-MLC20 szubsztráttal minimálisan hígított B50, H9C2 és HepG2 sejt lizátumokban mértük a foszfatáz aktivitás változását az inhibitorok (OA, TM, MC-LR, CA és EGCG) különböző koncentrációjú oldatának a sejtekkel történő 60 perces inkubációját követően. A reakcióidő 1-2 perc között volt, amely megközelítőleg a szubsztrát 20%-os átalakulását eredményezte.



26. ábra A vizsgált inhibitorok hatása B50 (felső), H9C2 (középső) és HepG2 (alsó) sejtek foszfatáz aktivitására

A sejteket OA, TM, MC-LR, CA és EGCG ábrán feltüntetett koncentrációjú oldatával 1 órán keresztül inkubáltuk, majd feltárás után mértük a foszfatáz aktivitás változását ^{32}P -MLC20 szubsztráttal. A kezeletlen sejtek foszfatáz aktivitását tekintettük 100%-nak. A kísérletek eredményét 3-5 független mérés átlagaként adtuk meg a szórásokkal. (n.s. nem szignifikáns, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.)

A 26. ábrán látható, hogy az inhibitorok eltérő hatást fejtenek ki a különböző sejtvonalak foszfatáz aktivitására. A B50 sejtekre kifejtett foszfatázgátló hatás a legalacsonyabb. Az OA közel hasonló mértékben gátolt a B50 és H9C2 sejtekben, míg a HepG2 esetén, főként a

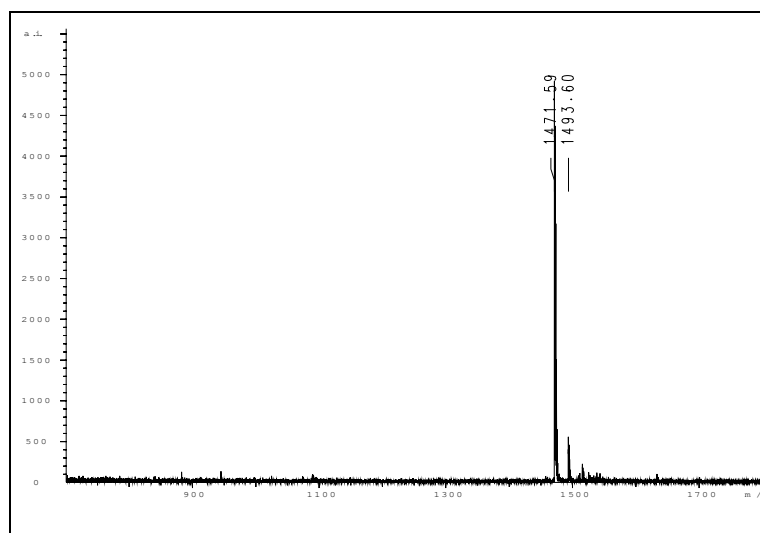
magasabb koncentrációkban jelentősebb mértékű gátlást okozott. A TM kezelés a H9C2 sejtek esetén csaknem teljes gátláshoz vezetett, míg a másik két sejtvonalon csak részlegesen csökkentette a foszfatáz aktivitást. A MC-LR és az EGCG csak kisebb mértékben, de szignifikánsan csökkentette az aktivitást, míg a CA a B50 és HepG2 sejtekben nem, a H9C2 esetén csak kismértékű, de szignifikáns változást mutatott.

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy ezen inhibitorok gátló hatása függ az alkalmazott sejtek típusától. Megfigyelhető, hogy az inhibitorok foszfatázgátló hatása a neuroblasztóma sejtekben alacsonyabb, mint a kardiomiocita vagy a hepatokarcinóma sejtekben és ez összefüggésben lehet az agyi eredetű lipidek kisebb mértékű inhibitorkötő kapacitásával.

Protein foszfatázok kölcsönható fehérjéinek izolálása sejtizrátumból

Mikrocisztin-LR biotinilálása, tisztítása és ellenőrzése

Célunk volt egy olyan reverzibilis foszfatáz immobilizálási technika kidolgozása, amellyel a foszfatázok kölcsönhatási vizsgálatai kivitelezhetőek SPR rendszerben, illetve a foszfatázok és kölcsönható fehérjék izolálhatóak sejtizrátumból.



27. ábra A biotinilált MC-LR MS spektruma

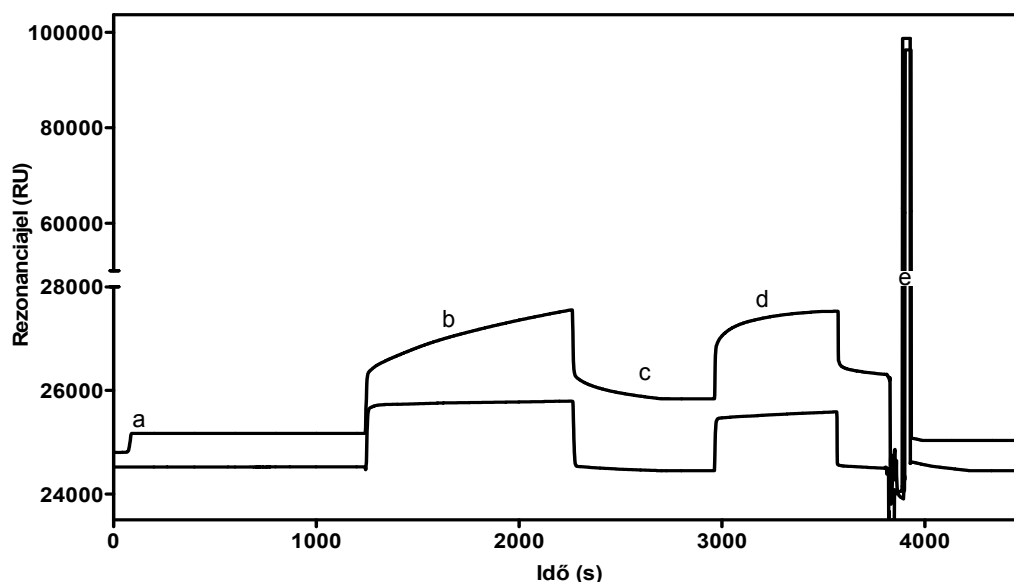
A mikrocisztin biotinilálását és HPLC tisztításának hatásfokát MS analízissel (MALDI-TOF-MS) ellenőriztük, amelynek számított molekulatömege ($M+H^+=1471,75$ Da) jó egyezést mutat a mért értékkel ($M+H^+=1471,59$ Da).

Ehhez a mikrocisztin-LR-t használtuk fel, amely számos protein foszfatáz közös, hatékony gátlószere. A MC-LR biotinilálása során kapott reakcióelegyet fordított fázisú HPLC oszlopon tisztítottuk, a kapott kromatogram alapján a szintézis hatásfoka megközelítette a

60%-ot. A 27. ábrán látható termékről készült tömegspektrometriás felvételen azonosított két csúcs megfelel a biotinilált MC-LR hidrogénnel (1471,59 Da, $[M+H^+]$) és nátriummal (1493,60 Da, $[M+Na^+]$) egyszeresen pozitívan ionizált formájának. A protonált biotin-MC-LR $[M+H^+]$ MS szoftverrel számított molekulatömege 1471,75 Da, amely megfelelő egyezést mutat a mért értékkel.

A biotinilált MC-LR immobilizálása és tesztelése a streptavidinnel konjugált (SA) szenzor chip felületén

Az SA szenzor chip egyik felületét telítettük biotinilált MC-LR-rel (ld. 28. ábra a), ami átlagosan 400 RU egység volt, ez megközelítőleg 400 pg/mm², vagy 0,27 pmol/mm² immobilizált biotin-MC-LR-nek felel meg. Kontrollként módosítatlan felületet használtunk. A felület foszfatázkötő kapacitását rekombináns PP1c-vel (ld. 28. ábra b szakasza) vizsgáltuk. A 28. ábrán látható, hogy a rPP1cδ a kontroll felülethez nem, míg a mikrocisztinnel borított felülethez jól kötődött. Az aspecifikusan kötődött enzimet nagy sebességű, 10 perces mosással távolítottuk el a felületről (ld. 28. ábra c szakasza). A mosást követően ~800 RU egységnek megfelelő rPP1cδ stabilan immobilizálódott a biotin-MC-LR-rel módosított SA chip felületén, ami 800 pg/mm² vagy 0,021 pmol/mm² rPP1cδ-nak felel meg. Ez azt jelenti, hogy az immobilizált biotin-MC-LR kevesebb, mint 10%-a képes a rPP1cδ-t kötni. Ennek az lehet az oka, hogy a közel 25-ször nagyobb molekulatömegű enzim (~38 kDa) kötődése során lefed számtalan szabad mikrocisztin molekulát a környezetében, ezzel sztérikusan gátolva ezekhez további enzim molekulák kötődését. Vizsgáltuk a biotin-MC-LR-rPP1cδ között kialakuló kölcsönhatás erősségét és stabilitását abból a szempontból, hogy vajon képes-e a mikrocisztin a felületen tartani az enzimet abban az esetben is, ha ahhoz kölcsönható fehérjék is asszociálnak. Ezért a PP1c egyik regulátor alegységét, a tisztított rekombináns GST-MYPT1-et injektáltuk (ld. 28. ábra d) a biotin-MC-LR-rPP1cδ komplex által borított felületre.

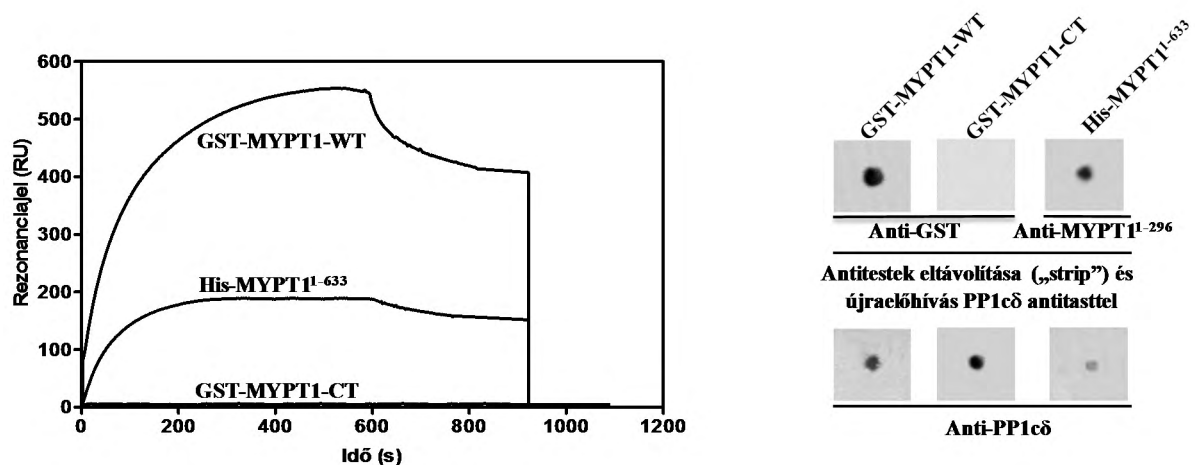


28. ábra A biotinilált-MC-LR immobilizálása SA chip felületére, majd a felület foszfatázkötő kapacitásának vizsgálata

A biotin-MC-LR-t közvetlenül immobilizáltuk (a) streptavidinnel gyárilag módosított szenzor chip felületére (felső görbe), amelyet 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ áramlási sebességgel mostunk. Kontrollként módosítatlan, biotin-MC-LR mentes felületet használtunk (alsó görbe). A felület foszfatázkötő kapacitását rekombináns PP1c δ injektálásával vizsgáltuk (b), amelyet 10 perces mosás követett (c). A kialakult biotin-MC-LR-PP1c δ komplex stabilitását GST-MYPT1-WT injektálásával teszteltük (d), majd 5 perces mosást követően a felületen kialakult komplexet 0,5%-os TFA oldattal visszanyertük.

A GST-MYPT1 ~ 500 RU mennyiségben kötődött ($0,0034 \text{ pmol}/\text{mm}^2$), ami azt jelenti, hogy a felületen kötött rPP1c δ kevesebb, mint 20 %-a lépett kölcsönhatásba a regulátor alegységgel. A felület mosását követően a kötődött fehérje komplexet 0,5%-os TFA oldattal nyertük vissza (ld. 28. ábra e), ami nem befolyásolta a streptavidin-biotin kölcsönhatást, így visszamaradt az újrahasználható biotin-MC-LR-rel borított felület. A kísérletet megismételtük a MYPT1 regulátor alegység PP1c-hez kötődő (His-MYPT1¹⁻⁶³³, N-terminális fragmentum) és nem kötődő (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴, C-terminális fragmentum) szakaszával is, a kiértékelt, kontroll felületen kapott rezonanciajellel csökkentett szenzorgramot a 29. ábra szemlélteti. A teljes hosszúságú és a PP1c-kötő MYPT1 fragmentum jelentősen növelte a rezonanciajelet, míg a nem kötődő peptidszakasz nem okozott szignifikáns változást a rezonanciajelen.

A felületről visszanyert fehérjék azonosítását dot-immunoblot technikával végeztük. A mintákban a GST-MYPT1-et és C-terminális fragmentumát anti-GST, a His-MYPT1¹⁻⁶³³-at anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, a rPP1c δ -t anti-PP1c δ antitesttel azonosítottuk. A minták tartalmazták a regulátor alegységet és annak PP1c-kötő fragmentumát, valamint minden esetben a rPP1c δ -t. A PP1c-t nemkötő fragmentum nem volt detektálható a visszanyert mintákban.



29. ábra A biotin-MC-LR szenzor chip felület tesztelése

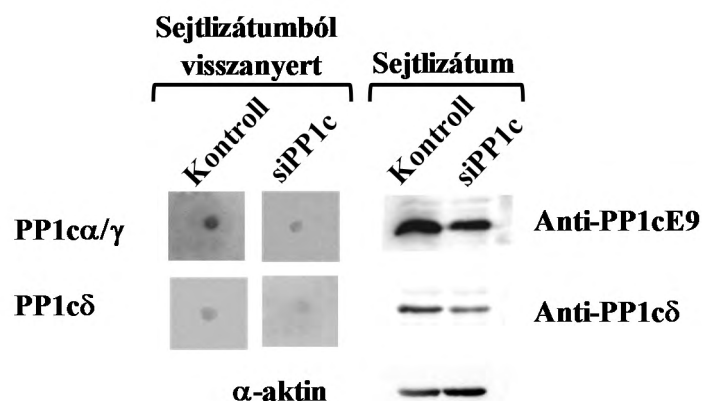
GST-MYPT1-WT, a GST-MYPT1-CT és a His-MYPT1¹⁻⁶³³ kötődésének vizsgálata biotin-MC-LR felületen immobilizált rPP1cδ-hoz, majd azonosításuk a visszanyert mintából dot blot analízissel

A kontroll kísérlet igazolta, hogy a szenzor chip felületén immobilizált biotin-MC-LR nemcsak a rekombináns PP1cδ-t, hanem annak regulátor alegységeit és feltételezhetően más kölcsönható partnereit is képes a felületen tartani.

PP1c és PP2Ac, valamint kölcsönható fehérjeinek azonosítása kontroll és kezelt HaCaT sejtek lizátumában

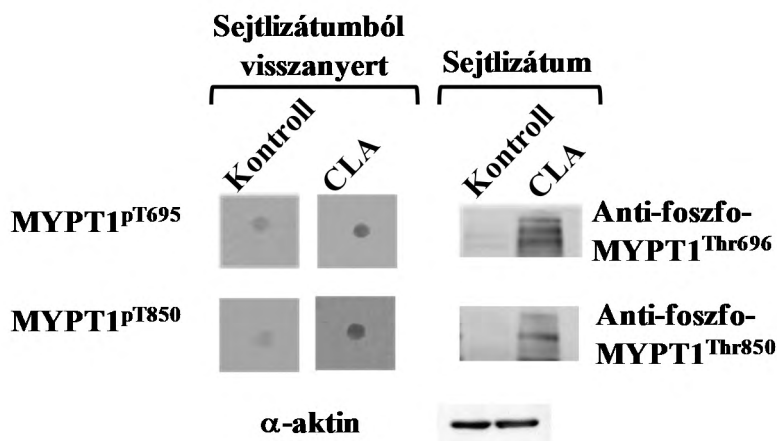
Az izolálás során a készülék külső egységét (Surface Prep egység 2) használtuk. Ez az egység a felületet nem osztja cellákra, hanem egyetlen nagyobb cellát hoz létre. A nagyobb felületen nagyobb mennyiségű biotin-MC-LR immobilizálható, ami a lizátumból történő foszfatázok és kölcsönható partnereinek izolálása során nagyobb mennyiségű visszanyert mintát eredményez.

Elsőként vizsgáltuk a PP1c különböző izoformáinak mennyiségi változását normál és PP1c csendesített HaCaT sejtekben. Kontrollként Western blot analízist is végeztünk. A 30. ábrán látható, hogy csendesítés hatására csökkent a PP1c mennyisége a sejtekben, amely a dot blot alapján a visszanyert mintában, valamint a Western blot alapján a sejt-lizátumban is tükröződik.



30. ábra A PP1c mennyiségének vizsgálata normál és PP1c csendesített HaCaT sejtekben
A sejtlizátumból visszanyert mintákban (az ábra bal oldalán) dot blot analízissel, illetve a lizátumban Western blottal (az ábra jobb oldalán) vizsgáltuk a PP1c mennyiségének változását PP1α/γ (PP1cE9) izoenzimekre és PP1cδ izoformára specifikus antitestekkel.

Vizsgáltuk azt is, hogy adott fehérje foszforilációjának emelkedése vagy csökkenése detektálható-e a visszanyert mintában. A HaCaT sejteket 100 nM kalikulin A-val kezeltük, amelynek hatására számos foszfatáz gátlódik, a fehérjék foszforilációja pedig ezáltal növekszik, ami például a MYPT1 Thr696 és Thr853 oldalláncainak foszforilációjához vezet.



31. ábra A foszforilált MYPT1 mennyiségének vizsgálata normál és CLA kezelt HaCaT sejtekben

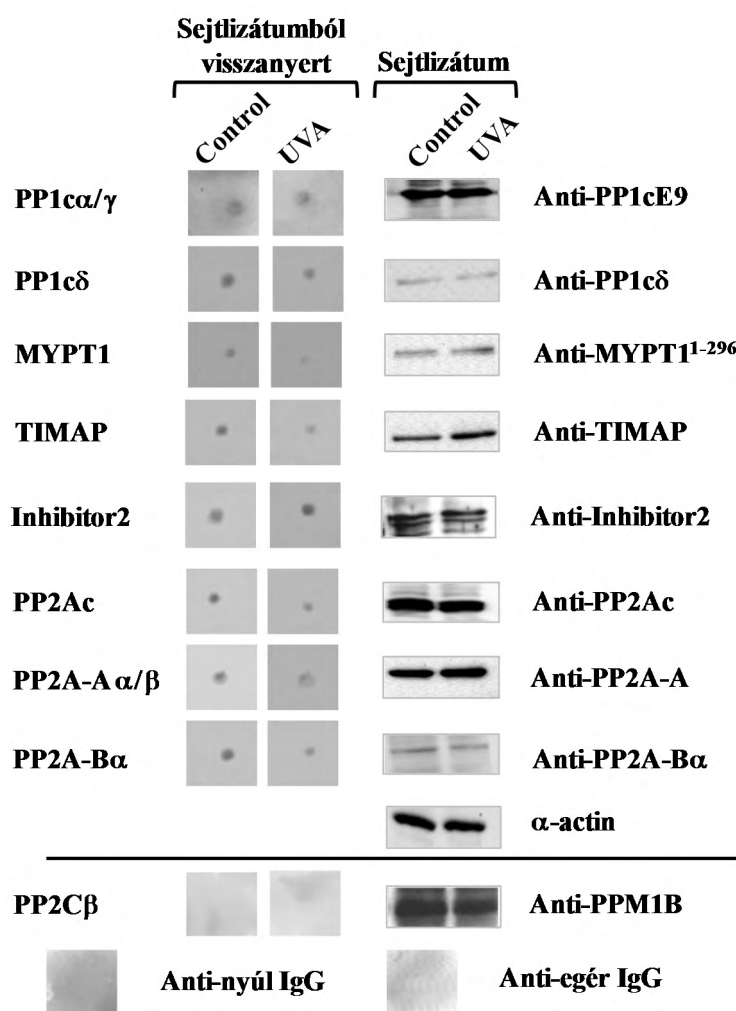
A visszanyert mintákban (az ábra bal oldalán) dot blot analízissel és a lizátumban Western blottal (az ábra jobb oldalán) vizsgáltuk a MYPT1^{pT695} és MYPT1^{pT850} mennyiségének a változását.

A 31. ábrán látható, hogy e határozott foszforilációs változások a sejtlizátum és a visszanyert minták elemzésével is kimutathatók a foszforilálódó oldalláncokra specifikus antitestekkel.

Eredményeinkből arra következtetünk, hogy ugyan a dot blot analízis általában nem alkalmas kvantitatív adatok meghatározására, ennek ellenére úgy tűnik, hogy a detektált jel arányos a fehérjék lizátumban lévő koncentrációjával, így a kezelések hatására bekövetkező mennyiségi változások követhetőek.

PP1c és PP2Ac kölcsönható partnereinek izolálása és azonosítása normál és UVA besugárzott HaCaT sejtek lizátumából

Normál és UVA fénnel besugárzott HaCaT sejtekből preparált sejt-lizátumot áramoltattunk át a biotin-MC-LR-rel borított szenzor chip felülete felett és a visszanyert mintákat közvetlenül nitrocellulóz membránra cseppentve dot blot technikával vizsgáltunk számos PP1c és PP1Ac regulátor alegységet és inhibitor fehérjét.

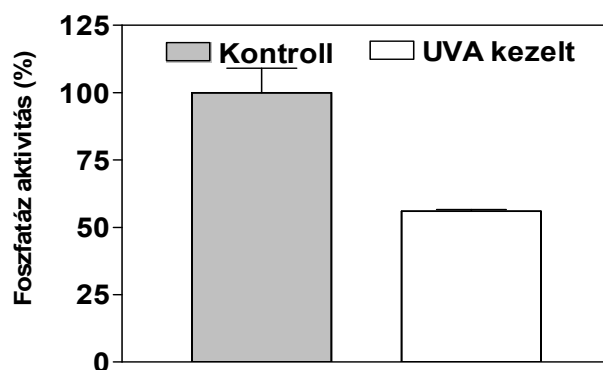


32. ábra A PP1c, PP2Ac, valamint regulátor és inhibitor fehérjeinek vizsgálata normál és UVA besugárzott HaCaT sejtekben

A sejtlizátumból visszanyert mintákban (az ábra bal oldalán) dot blot analízissel, illetve a lizátumban Western blottal (az ábra jobb oldalán) vizsgáltuk az ábrán feltüntetett fehérjéket.

A 32. ábrán látható, hogy a visszanyert mintákban azonosítottuk mind a PP1c-t, mind a PP2Ac-t; a PP1c kölcsönható partnerei között a MYPT1, a TIMAP és az inhibitor-2 fehérjét; továbbá a PP2Ac A és B regulátor alegységét. Az I2 fehérje kivételével megfigyelhető, hogy mind a PP1c, mind a PP2Ac, illetve ezek vizsgált regulátor alegységei kezeletlen sejtekhez viszonyítva kisebb mennyiségben nyerhetők ki az UVA fénnyel besugárzott sejtekből, mint a kezeletlenekből. Ugyanakkor a kezeletlen és az UVA kezelt HaCaT sejtek lizátumából végzett Western blot szerint e fehérjék mennyisége közel azonos, azaz a kezelés hatástalan a fehérjék expressziójára.

Foszfataz aktivitásméréseket végeztünk normál és UVA besugárzott sejtlizátumokból, amelyek igazolták, hogy a foszfataz aktivitás HaCaT sejtekben közel 60%-ra csökken az UVA fénnyel való besugárzás hatására (33. ábra).



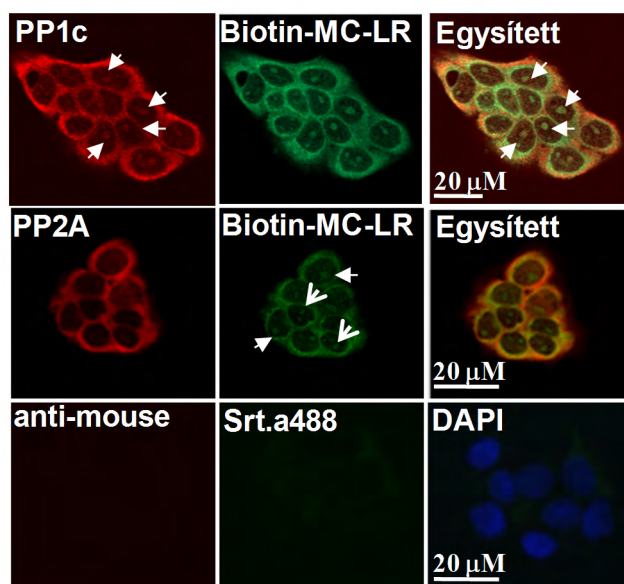
33. ábra Foszfataz aktivitás változása HaCaT sejtek UVA besugárzásának hatására
 Normál és UVA besugárzott HaCaT sejtekben mértük a foszfataz aktivitást ^{32}P -MLC20 szubsztráttal.

A sejtlizátumból végzett Western blot elemzések viszont nem mutattak csökkenést a vizsgált fehérjék mennyiségében, ezért a visszanyert mintákban UVA hatására megfigyelt csökkenést nem a fehérjék degradációja vagy expressziós változása okozza. A pontos mechanizmus nem ismert, viszont feltételezzük, hogy a foszfatazok szerkezetváltozása okozhatja az aktivitás csökkenését és a felületen immobilizált MC-LR-hez való kisebb affinitást.

A kapott eredmények azt igazolják, hogy a módszer alkalmas a mikrocisztin-érzékeny protein foszfatazok kölcsönható partnereinek azonosítására különböző sejtkultúrák fiziológias vagy kóros elváltozása során.

A biotin-MC-LR alkalmazása a protein foszfatázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára

A biotin-MC-LR foszfatázokkal való kölcsönhatása megfelelően erős ahhoz, hogy alkalmas legyen azok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára. A fixált sejtekben képződött biotin-MC-LR-foszfatáz komplex azonosítására fluoreszcensen jelzett streptavidint használtunk. A 34. ábrán látható, hogy a biotin-MC-LR kifejezetten a citoplazmában és a perinukleáris régióban jelenik meg, valamint a magvacskában is azonosítható. A specifikus biotin/streptavidin blokkolás ellenére a jelzett streptavidin aspecifikus kötődése halvány, általános festődést mutat a sejt egészén. A biotin-MC-LR jelölhet számos protein foszfatázt, viszont a PP1c-hez és a PP2Ac-hez való kötődését konfokális mikroszkópiával végzett kolokalizációs kísérletekkel is kimutattuk specifikus anti-PP1c és anti-PP2Ac antitestek segítségével.



34. ábra Protein foszfatázok lokalizációjának kimutatása biotin-MC-LR és anti-PP1c vagy anti-PP2Ac felhasználásával

Paraformaldehiddel fixált, majd permeabilizált HaCaT sejteket inkubáltunk biotin-MC-LR, valamint anti-PP1c vagy anti-PP2Ac oldatával, amelyeket fluoreszcensen jelölt streptavidinnel, valamint másodlagos egér antitesttel detektáltunk.

Az egyesített képeken a biotin-MC-LR és a PP1c, valamint a PP2Ac kolokalizációja főként a citoplazmában látható, jóllehet a PP1c diffúz citoszolikus festődést mutat, valamint fellelhető a sejtmagban is. A PP2Ac-vel való kolokalizáció nagyrészt a perinukleáris régióban és a magvacskákban figyelhető meg. A biotin-MC-LR fluoreszcens jele lefedi ezeket a régiókat a sejtekben, ami igazolja nagy affinitását és szelektivitását ezekhez az enzimekhez.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a biotin-MC-LR alkalmas a mikrocisztin-érzékeny protein foszfatázok sejten belüli általános lokalizációjának meghatározására.

Megbeszélés

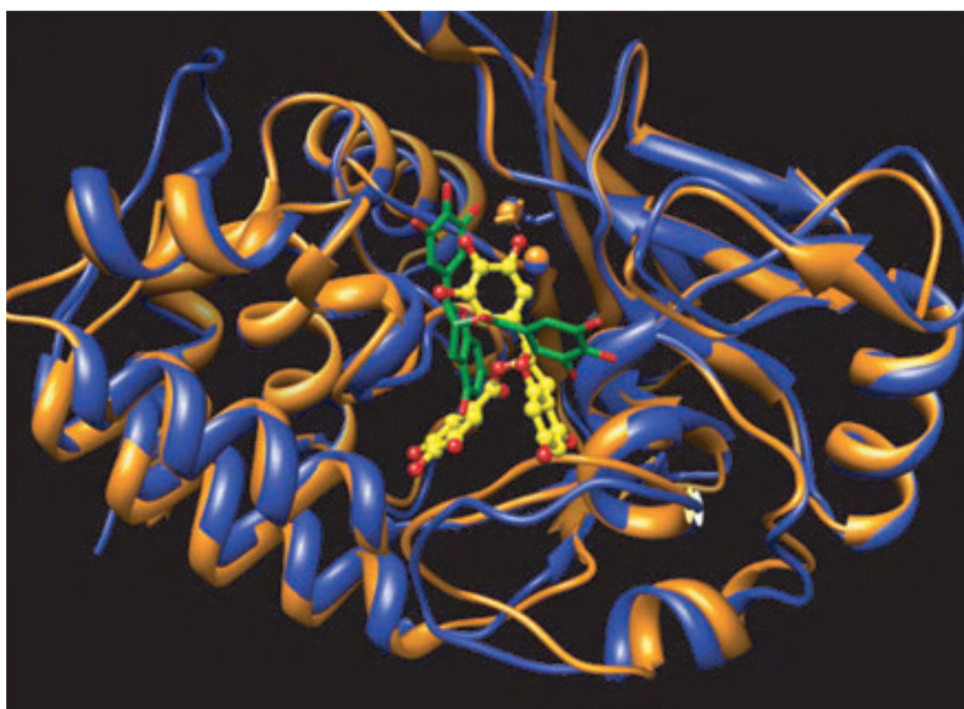
Tanninok hatása a PP1c és PP2Ac aktivitására és a gátlási mechanizmusának vizsgálata

A polifenolok hidrofób jellegű kölcsönhatásokat alakítanak ki fehérjékkel (Haslam és mtsai., 1996; Frazier és mtsai., 2009; Gyemant és mtsai., 2009), miközben aromás gyűrűikkel intermolekuláris kölcsönhatásokat létesíthetnek egymással is (Baxter és mtsai., 1997; Wroblewski és mtsai., 2001; Kiss és mtsai., 2013), amely nagymértékben megnehezíti a kölcsönhatási vizsgálatok (ITC, SPR) kiértékelését. A tanninok számos enzim aktivitására fejtenek ki gátló vagy aktiváló hatást (Zhao és mtsai.; Bode és mtsai., 2004; Feng és mtsai., 2014), viszont foszfatázokra kifejtett hatásukat csak részben tárták fel (Erdelyi és mtsai., 2005; Qin és mtsai., 2008), a gátlás mechanizmusáról pedig semmiféle adatunk nincs. Megvizsgáltuk a PGG, az EGCG és az Aleppói tannin foszfatáz aktivitásra kifejtett hatását, továbbá az EGCG szerkezeti rokon vegyületeinek gátló hatását azzal a céllal, hogy az EGCG szerkezetében a foszfatázokkal kölcsönható régiókat azonosítsuk.

Eredményeink arra utalnak, hogy a PGG, az EGCG és az Aleppói tannin hatékony inhibitorai a protein foszfatázoknak. Részlegesen szelektív gátlószerei a PP1c-nek, míg PP2Ac-re kifejtett hatásuk csak kisebb mértékű, ami lehetővé teszi a PP1c és a PP2Ac aktivitásának megkülönböztetését a tanninok bizonyos koncentrációit alkalmazva. Az EGCG különböző szerkezeti rokon vegyületei és egységei foszfatáz aktivitásra kifejtett hatásából arra következtetünk, hogy a központi flavonol molekula és a hozzá kapcsolódó galloil-csoport - térállásától függetlenül - fontos szerepet töltenek be a gátlási folyamatban, míg a polifenolgyűrű és a fenolos hidroxil-csoportok száma csak kevésbé befolyásolja a gátlás mértékét. SPR kompetíciós kísérletekkel igazoltuk, hogy a PP1c hidrofób árkával kölcsönható foszfatáz inhibitorok (MC-LR, OA) gátolják a PGG és az EGCG kötődését, ami közös kötőhelyre utal az enzim szerkezetében. Feltételezéseinket NMR spektroszkópai vizsgálatok és számítógépes molekula-dokkolási adatok is megerősítették (Kiss és mtsai., 2013). Mindezek alapján megállapítható, hogy a tanninok hidrofób kölcsönhatást alakítanak ki a PP1c aktív centrumának környezetében található hidrofób árokkal. Az enzim-tannin kölcsönhatást az EGCG hidroxil-csoportjainak aminosav oldalláncokkal kialakított hidrogénkötései tovább stabilizálják. A tanninok foszfatáz aktivitásra kifejtett hatásuk gyengébb ($IC_{50} \geq 0,2-0,47 \mu M$), mint a jól ismert foszfatázgátló toxinoké ($IC_{50} \leq 0,1-0,05 nM$) (Sheppeck és mtsai., 1997; Honkanen és mtsai., 2002). Ezzel összhangban van az is, hogy a tanninok PP1c-vel kialakított komplexének stabilitása (K_A) is nagyságrendekkel kisebb, mint a toxinokkal kialakított komplexeké (Stenlund és mtsai., 2006). A klasszikus foszfatáz inhibitorok gátló hatása a hidrofób árokhoz való kötődésükön kívül az aktív

centrummal való kölcsönhatásukon keresztül is megvalósulhat, amely részben vagy egészben érinti a hidrolizálható foszfátot és a fémionokat kötő régiók lefedését, valamint hidrogénkötések kialakítását a centrum közelében lévő aminosav oldalláncokkal (Colby és mtsai., 2003). Eredményeink arra utalnak, hogy a vizsgált tanninok foszfatázgátló hatását az enzim hidrofób árkával való kölcsönhatás és azért 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 a 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.



**35. ábra Az EGCG elhelyezkedése a PP1c és a PP2Ac szerkezetében
(számítógépes molekulamodellő vizsgálat)**

PP1c (kék), PP2Ac (narancssárga), az EGCG a PP1c szerkezetében (sárga), a PP2Ac szerkezetében (zöld)

Az EGCG molekula pozíciója is különbözik a két enzimben, azonban ez még nem indokolná az eltérő gátlási hatékonyságot. A szerkezeti és modellezési adatok alapján feltételezhető, 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 (35. ábra). 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 a PP2Ac-re megfigyelt specificitásbeli különbség 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 egyszerű felépítésüknek köszönhetően szerkezetük kémiai módosításával feltehetően új és szelektívebb foszfatázgátló molekulák szintézisének alapmolekulái lehetnek.

Foszfatáz inhibitorok membránpermeabilis sajátságainak vizsgálata

Foszfatáz inhibitorok gátló hatásának kifejtésében fontos szerepet játszik a sejtmembránnal kialakított kölcsönhatásuk, illetve diffúziójuk a sejtbe, amelyet korábban már számos esetben vizsgáltak (Namboodiripad és mtsai., 1996; Favre és mtsai., 1997). Az eddig alkalmazott módszerek viszont nem szolgáltatottak kvantitatív adatokat e kölcsönhatásokra vonatkozóan. Membránasszociációs és -disszociációs kísérleteink elvégzéséhez SPR detektáláson alapuló mérési technikát alkalmaztunk és az inhibitorok kölcsönhatását különböző szövetekből izolált lipidekből előállított micellákkal tanulmányoztuk. Ezt a módszert gyakran alkalmazzák gyógyszer-molekulák és különböző homogén vagy inhomogén összetételű lipid micellák kölcsönhatásának jellemzésére (Abdiche és mtsai., 2004; Cho és mtsai., 2004; Besenicar és mtsai., 2006). Szöveti eredetű teljes lipid kivonatokból preparált micellák és foszfatázgátló toxinok asszociációs-disszociációs tulajdonságait azonban elsőként tanulmányoztuk. Megvizsgáltuk a klasszikus (OA, TM, MC-LR, CA, CsA) és az újonnan azonosított (EGCG) foszfatáz inhibitorok kötődésének kinetikai profilját borjú agy-, szív- és májszövet eredetű lipid micellákhoz. A lipid micellák 20 °C-on stabilan immobilizálódtak a szenzor chip felületére, a foszfatáz inhibitorok lipid micellákkal kialakított kölcsönhatása reverzibilis volt. Az inhibitorok disszociációja az eltérő lipidösszetételű micellák felületéről nagymértékű hasonlóságot mutatott, viszont asszociációjukban szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. A membránasszociációs kísérleteket elsőként végeztük el 37 °C-on (korábban 20-25 °C), amellyel a lipid-inhibitor kölcsönhatás tulajdonságai részletesebben

jellemezhetőek. Fiziológias hőmérsékleten az asszociációs különbségek eltűntek, az inhibitorok kötődésének koncentrációfüggése megszűnt és a disszociáció nagymértékben lelassult. Feltételezhető, hogy a hidrofób karakterű foszfatáz 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. Irodalmi adatok szerint az OA esetén kétórás kezelés szükséges a hatékony gátló hatás kifejtéséhez (Favre és mtsai., 1997), ami a TM esetén még hosszabb idő mikromólos koncentrációban való alkalmazása esetén is. A részlegesen hidrophil 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 bejutnak a „fluidabbá” vált micella belsejébe, visszatartódnak és csak lassan képesek kijutni, majd disszociálni az injektálást követő mosási fázisban. Ezzel szemben a kisebb molekulatömegű gátlószerek (CA, EGCG) vagy egyáltalán nem vagy akadály nélkül mozognak a lipid membránban 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, leginkább pedig a májlipidekhez. 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* kísérletek eredményével. Mindkét esetben megfigyelhető volt, hogy a membránok telítődése már alacsony inhibitor koncentráció esetén bekövetkezett, 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 inhibitorokötő kapacitása is befolyásol.

Az aktivitásmérések és a látszólagos disszociációs egyensúlyi állandók között nem találtunk összefüggést. A számított látszólagos disszociációs állandó ($K_{D(app)}$) értéke alapján az OA nagy affinitást mutatott a lipidekkel, ezzel szemben csak kismértékű aktivitáscsökkenést okozott a sejtekben még a legnagyobb koncentrációban is. A TM-re kapott $K_{D(app)}$ értéke 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 (H9C2). Ezen megállapítások azt sugallják, hogy az inhibitorok gátló hatásának kifejtésében nemcsak a toxinok lipidekkel

kialakuló kölcsönhatásának erőssége az egyetlen befolyásoló tényező, hanem más faktorok (pl. hőmérséklet, transzporterek) is szerepet játszanak. A MC-LR az epesav transzporterén keresztül képes bejutni a májsejtekbe (Runnegar és mtsai., 1995). Az általunk vizsgált HepG2 sejtvonal nem tartalmazza az említett transzportert (Boyer és mtsai., 1993), így nem is meglepő, hogy a MC-LR gátlása mindhárom sejtvonalon hasonló. Méréseink alapján megállapítható, ami korábbi kísérletekkel is összhangban van (Mathe és mtsai., 2009), 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 foszfatázgátló 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.

Protein foszfatázok kölcsönható partnereinek izolálása és azonosítása HaCaT sejtizátumból

A sejtfolyamatok foszforilációval történő szabályozásában fontos szerepe van a protein foszfatáz katalitikus alegység regulátor és inhibitor fehérjékkel, valamint szubsztrát fehérjékkel kialakított kölcsönhatásának. A foszfatázok kölcsönható partnereinek izolálására és azonosítására eddig alkalmazott hagyományos módszerek (immunprecipitáció vagy pull down, amit vagy western blot vagy tömegspektrometria követ) (Kolozsvári és mtsai., 2012; Lontay és mtsai., 2012) idő és anyagigényesek, sok kísérleti lépést igénylő technikák és viszonylag nagymennyiségű minta és számos fehérje/antitest szükséges a kivitelezésükhöz. Az SPR alapú technika elvileg alkalmas fehérje komplexek izolálására kismennyiségű sejtizátumból, amely a visszanyert minta tömegspektrometriás analízisével kiegészítve sokkal gyorsabban szolgáltatathat eredményeket, mint a konvencionális módszerek. Az izoláláshoz szükséges egy olyan, a szenzor chip felületén immobilizálható „befogó” molekula, amely megfelelően stabil komplexet képez a célfehérjével, és 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) (Honkanen és mtsai., 1990; Honkanen és mtsai., 2002; Zhang és mtsai., 2013) és kölcsönható fehérjék izolálása gyors és minimális mintamennyiséget igényel. A MC-LR-t biotiniláltuk és streptavidinnel kovalensen módosított

szenzor chip felületére immobilizáltuk. A biotin-streptavidin kölcsönhatás megfelelően erős ($K_D \sim 10^{-15}$) ahhoz, hogy a felületen tartsa a sejtlizátumból kikötött foszfatázokat és kölcsönható partnereit, valamint a visszanyerési folyamat során alkalmazott eljárás sem disszociálja azt a felületről, így a kölcsönhatás vizsgálatára többször is felhasználható. A módszert első lépésben rekombináns PP1c-vel, annak MYPT1 regulátor alegységével és fragmentumaival teszteltük. Megállapítottuk, hogy a biotin-MC-LR képes a rPP1c-t a felületen stabilan immobilizálni, az így kialakult komplex köti a teljes hosszúságú MYPT1 regulátor alegységet és annak N-terminális fragmentumait, míg C-terminális szakaszát nem.

Normál és PP1c csendesített, valamint a 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 fénnel besugárzott HaCaT sejtekben a PP1c, a PP2Ac, valamint regulátor és inhibitor fehérjék 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, viszont a sejtlizátum Western blot vizsgálata nem mutatott változást a fehérjék mennyiségében. Feltételezhető, hogy UVA besugárzás hatására a sejtben keletkezett reaktív oxigén gyökök oxidálják a fémionokat és/vagy a cisztein oldallácokat a PP1c és PP2Ac-ben (Kim és mtsai., 2003), 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, tehát a kötőkapacitás csak részben kihasznál. Számításaink és kísérleti próbálkozásaink alapján a kötődő fehérjék nagy száma és

legfeljebb néhány femtomólos mennyisége a visszanyert mintában MS analízist nem tesz lehetővé.

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 fiziológias 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 az 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.

Összefoglalás

A sejtfolymatok szabályozásának egyik fontos mechanizmusa a fehérjék reverzibilis foszforilációja, amelynek mértékét a protein kináz/foszfátáz aktivitás arány határozza meg. E folyamatokban fontos szerepe van a foszfo-Ser/Thr specifikus protein foszfátáz-1 (PP1) és -2A (PP2A) enzimeknek, amelyek katalitikus (PP1c és PP2Ac) és regulátor alegységekből állnak, szabályozásuk fontos eleme pedig kölcsönhatásuk regulátor/inhibitor fehérjékkel és toxinokkal. Ezért új inhibitorok azonosítása, azok kötődési és gátlási mechanizmusainak feltárása, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása a terület aktuális kutatási céljai közé tartoznak. Munkánk fő célkitűzése a felszíni plazmonrezonancián (SPR) alapuló kötődési módszer alkalmazása volt e kérdések vizsgálatában.

Kimutattuk, hogy a tanninok közül az EGCG, a PGG és az Aleppói tannin hatékonyan gátolják a PP1c és PP2Ac aktivitását, a PP1c részlegesen szelektív gátlószereinek tekinthetők. SPR kompetíciós kísérletek alapján hatásukat a PP1c katalitikus centrumának hidrofób árkába kötődve fejtik ki. Foszfátázgátló inhibitor molekulák (toxinok, tanninok, ciklikus peptidek) membránpermeábilis sajátságait modelleztük szöveti eredetű lipidekből előállított micellákkal történő kölcsönhatásuk SPR módszerrel történő meghatározása alapján. Az inhibitorok membránasszociációja fiziológias hőmérsékleten gyors, mértéke függ a lipidösszetételtől, disszociációjuk viszont lassú, feltehetően az inhibitorok lipid micellákban történő interkalációja miatt. A foszfátázgátló 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 PP1c és PP2Ac, valamint kötődő fehérjék és azok foszforilációs állapota megváltozásának detektálására kontroll, foszfátázgátlóval kezelt vagy UVA besugárzott HaCaT sejtek lizátumából.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a tanninok a foszfátázgátló molekulák új családjának tekinthetők és kémiai módosításukkal hatékony, kevésbé toxikus és szelektív gátlószerek fejleszthetők. A foszfátázgátló toxinok membrán lipidekkel való kölcsönhatási sajátságaik befolyásolják az inhibitorok különböző eredetű sejtekre kifejtett gátló hatását. Az SPR szenzor chip felületén immobilizált MC-LR alkalmas a foszfátáz katalitikus alegységek, valamint azok kölcsönható fehérjéinek izolálására és ezt követő immunológiai kimutatására kontroll és különböző módon kezelt sejtek lizátumából.

Summary

The reversible phosphorylation of proteins is an important mechanism in the regulation of cellular processes, which is determined by the ratio of protein kinase/phosphatase activity. The phospho-Ser/Thr specific protein phosphatase-1 (PP1) and -2A (PP2A) are responsible for the dephosphorylation of many cellular proteins. They consist of catalytic and regulatory subunit(s), and their activity is mediated by interactions with regulatory/inhibitory proteins and toxins. Identification of new inhibitors, determination of their binding and inhibitory mechanisms and detection of regulatory protein-protein interactions are included in the actual research goals of this field. Our aim was to use the surface plasmon resonance (SPR) based binding technique in the investigation of these questions.

We found that tannin derivatives such as EGCG and PGG inhibit effectively the activity of PP1c and PP2Ac and they are partially selective inhibitors of PP1c exerting their inhibitory effect by binding to the substrate binding hydrophobic groove of PP1c as determined by SPR competition experiments. Membrane permeable properties of phosphatase inhibitor molecules (toxins, tannins, cyclic peptides) are modeled by their interaction to lipid micelles derived from different tissues detected by SPR method. The membrane-association of inhibitors is fast at physiological temperature and depends on the composition of the lipids, their dissociation is slow, probably due to the intercalation of the inhibitors in lipid micelles. The biotinylated form of phosphatase inhibitory microcystin-LR on the surface of streptavidin coupled sensor chip was used as capturing molecule to isolate the PP1c and PP2Ac as well as their interacting proteins from HaCaT cell lysate by SPR method. The immunological analysis of the recovered samples proved that the method is suitable for the detection of PP1c and PP2Ac as well as their interacting proteins and for the changes of their phosphorylation state after pathological challenges of HaCaT cells.

In summary, our results suggest that the tannin components represent a new and effective family of phosphatase inhibitory compounds, which are less toxic than the natural phosphatase inhibitory toxins and their chemical modification may be promising to develop selective inhibitors for the distinct phosphatase types. The interaction characteristics of phosphatase inhibitors to membrane lipids influence the inhibitory effect in a cell type dependent manner. The immobilized MC-LR on the surface of SPR sensor chip is suitable for isolation of phosphatase catalytic subunits as well as their interacting proteins followed by immunological detection from differently treated cell lysates.

Irodalomjegyzék

Abdiche Y. N., D. G. Myszka (2004). "Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore." Anal Biochem **328** (2): 233-243.

Ahmad N., D. K. Feyes, A. L. Nieminen, R. Agarwal, H. Mukhtar (1997). "Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells." J Natl Cancer Inst **89** (24): 1881-1886.

Alessi D., L. K. MacDougall, M. M. Sola, M. Ikebe, P. Cohen (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.

Anderluh G., M. Besenicar, A. Kladnik, J. H. Lakey, P. Macek (2005). "Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin." Anal Biochem **344** (1): 43-52.

Barford D. (1996). "Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases." Trends Biochem Sci **21** (11): 407-412.

Barisic S., C. Schmidt, H. Walczak, D. Kulms (2010). "Tyrosine phosphatase inhibition triggers sustained canonical serine-dependent NFkappaB activation via Src-dependent blockade of PP2A." Biochem Pharmacol **80** (4): 439-447.

Baxter N. J., T. H. Lilley, E. Haslam, M. P. Williamson (1997). "Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation." Biochemistry **36** (18): 5566-5577.

Besenicar M., P. Macek, J. H. Lakey, G. Anderluh (2006). "Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions." Chem Phys Lipids **141** (1-2): 169-178.

Boaru D. A., N. Dragos, K. Schirmer (2006). "Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study." Toxicology **218** (2-3): 134-148.

Bode A. M., Z. Dong (2004). "Targeting signal transduction pathways by chemopreventive agents." Mutat Res **555** (1-2): 33-51.

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

Boyer J. L., B. Hagenbuch, M. Ananthanarayanan, F. Suchy, B. Stieger, P. J. Meier (1993). "Phylogenic and ontogenic expression of hepatocellular bile acid transport." Proc Natl Acad Sci U S A **90** (2): 435-438.

Brautigan D. L. (2012). "Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling." FEBS J **280** (2): 324-345.

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

Campos M., P. Fadden, G. Alms, Z. Qian, T. A. Haystead (1996). "Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography." J Biol Chem **271** (45): 28478-28484.

Catimel B., J. Rothacker, J. Catimel, M. Faux, J. Ross, L. Connolly, A. Clippingdale, A. W. Burgess, E. Nice (2005). "Biosensor-based micro-affinity purification for the proteomic analysis of protein complexes." J Proteome Res **4** (5): 1646-1656.

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

Ceulemans H., W. Stalmans, M. Bollen (2002). "Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution." Bioessays **24** (4): 371-381.

Chen J., B. L. Martin, D. L. Brautigan (1992). "Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation." Science **257** (5074): 1261-1264.

Chen Y. H., M. X. Chen, D. R. Alessi, D. G. Campbell, C. Shanahan, P. Cohen, P. T. Cohen (1994). "Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M." FEBS Lett **356** (1): 51-55.

Cho S., J. H. Park, J. Yu, Y. K. Lee, Y. Byun, H. Chung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong (2004). "Preparation and characterization of reconstructed small intestinal brush border membranes for surface plasmon resonance analysis." Pharm Res **21** (1): 55-60.

Choy M. S., R. Page, W. Peti (2012). "Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins." Biochem Soc Trans **40** (5): 969-974.

Cohen P. (1989). "The structure and regulation of protein phosphatases." Annu Rev Biochem **58**: 453-508.

Cohen P. T. (1997). "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life." Trends Biochem Sci **22** (7): 245-251.

Cohen P. T. (2002). "Protein phosphatase 1--targeted in many directions." J Cell Sci **115** (Pt 2): 241-256.

Colby D. A., W. Liu, J. E. Sheppeck, H. B. Huang, A. C. Nairn, A. R. Chamberlin (2003). "A new model of the tautomycin-PP1 complex that is not analogous to the corresponding okadaic acid structure." Bioorg Med Chem Lett **13** (9): 1601-1605.

Cooper M. A. (2004). "Advances in membrane receptor screening and analysis." J Mol Recognit **17** (4): 286-315.

Cooper M. A., A. Hansson, S. Lofas, D. H. Williams (2000). "A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors." Anal Biochem **277** (2): 196-205.

Czikora I., K. M. Kim, A. Kasa, B. Becsi, A. D. Verin, P. Gergely, F. Erdodi, C. Csontos (2011). "Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1." Biochimie **93** (7): 1139-1145.

Egloff M. P., D. F. Johnson, G. Moorhead, P. T. Cohen, P. Cohen, D. Barford (1997). "Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1." EMBO J **16** (8): 1876-1887.

Endo S., X. Zhou, J. Connor, B. Wang, S. Shenolikar (1996). "Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor." Biochemistry **35** (16): 5220-5228.

Erb E. M., X. Chen, S. Allen, C. J. Roberts, S. J. Tendler, M. C. Davies, S. Forsen (2000). "Characterization of the surfaces generated by liposome binding to the modified dextran matrix of a surface plasmon resonance sensor chip." Anal Biochem **280** (1): 29-35.

- Erdelyi K., A. Kiss, E. Bakondi, P. Bai, C. Szabo, P. Gergely, F. Erdodi, L. Virag (2005). "Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells." Mol Pharmacol **68** (3): 895-904.
- Erdodi F., B. Toth, K. Hirano, M. Hirano, D. J. Hartshorne, P. Gergely (1995). "Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo." Am J Physiol **269** (5 Pt 1): C1176-1184.
- Favre B., P. Turowski, B. A. Hemmings (1997). "Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin." J Biol Chem **272** (21): 13856-13863.
- Feng H. L., L. Tian, W. M. Chai, X. X. Chen, Y. Shi, Y. S. Gao, C. L. Yan, Q. X. Chen (2014). "Isolation and purification of condensed tannins from flamboyant tree and their antioxidant and antityrosinase activities." Appl Biochem Biotechnol **173** (1): 179-192.
- Feng Z., G. Zhang, H. Zhang, D. Li, Y. Zhou (1999). "Inhibitory effect of recombinant FN polypeptide CH50 on the metastasis and tumor growth." J Tongji Med Univ **19** (4): 249-252, 279.
- Fernandez J. J., M. L. Candenias, M. L. Souto, M. M. Trujillo, M. Norte (2002). "Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes." Curr Med Chem **9** (2): 229-262.
- Frazier R. A., E. R. Deaville, R. J. Green, E. Stringano, I. Willoughby, J. Plant, I. Mueller-Harvey (2009). "Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins." J Pharm Biomed Anal **51** (2): 490-495.
- Gallego M., D. M. Virshup (2005). "Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping." Curr Opin Cell Biol **17** (2): 197-202.
- Gentry M. S., Y. Li, H. Wei, F. F. Syed, S. H. Patel, R. L. Hallberg, D. C. Pallas (2005). "A novel assay for protein phosphatase 2A (PP2A) complexes in vivo reveals differential effects of covalent modifications on different *Saccharomyces cerevisiae* PP2A heterotrimers." Eukaryot Cell **4** (6): 1029-1040.
- Gergely P., F. Erdodi, G. Bot (1984). "Heparin inhibits the activity of protein phosphatase-1." FEBS Lett **169** (1): 45-48.

Goldberg J., H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan (1995). "Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1." Nature **376** (6543): 745-753.

Gyemant G., A. Zajacz, B. Becsi, C. Ragunath, N. Ramasubbu, F. Erdodi, G. Batta, L. Kandra (2009). "Evidence for pentagalloyl glucose binding to human salivary alpha-amylase through aromatic amino acid residues." Biochim Biophys Acta **1794** (2): 291-296.

Hartshorne D. J., M. Ito, F. Erdodi (2004). "Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase." J Biol Chem **279** (36): 37211-37214.

Haslam E. (1996). "Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action." J Nat Prod **59** (2): 205-215.

Hemmings B. A., C. Adams-Pearson, F. Maurer, P. Muller, J. Goris, W. Merlevede, J. Hofsteenge, S. R. Stone (1990). "alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure." Biochemistry **29** (13): 3166-3173.

Hendrickx A., M. Beullens, H. Ceulemans, T. Den Abt, A. Van Eynde, E. Nicolaescu, B. Lesage, M. Bollen (2009). "Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1." Chem Biol **16** (4): 365-371.

Hirano K., B. C. Phan, D. J. Hartshorne (1997). "Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem **272** (6): 3683-3688.

Honing S., D. Ricotta, M. Krauss, K. Spate, B. Spolaore, A. Motley, M. Robinson, C. Robinson, V. Haucke, D. J. Owen (2005). "Phosphatidylinositol-(4,5)-bispophosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2." Mol Cell **18** (5): 519-531.

Honkanen R. E., T. Golden (2002). "Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?" Curr Med Chem **9** (22): 2055-2075.

Honkanen R. E., J. Zwiller, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow, A. L. Boynton (1990). "Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases." J Biol Chem **265** (32): 19401-19404.

Hunter T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell **80** (2): 225-236.

Ikehara T., S. Ikehara, S. Imamura, F. Shinjo, T. Yasumoto (2007). "Methylation of the C-terminal leucine residue of the PP2A catalytic subunit is unnecessary for the catalytic activity and the binding of regulatory subunit (PR55/B)." Biochem Biophys Res Commun **354** (4): 1052-1057.

Ingebritsen T. S., P. Cohen (1983). "Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation." Science **221** (4608): 331-338.

Ito M., T. Nakano, F. Erdodi, D. J. Hartshorne (2004). "Myosin phosphatase: structure, regulation and function." Mol Cell Biochem **259** (1-2): 197-209.

Janssens V., J. Goris (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.

Janssens V., J. Goris, C. Van Hoof (2005). "PP2A: the expected tumor suppressor." Curr Opin Genet Dev **15** (1): 34-41.

Janssens V., S. Longin, J. Goris (2008). "PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail)." Trends Biochem Sci **33** (3): 113-121.

Kamibayashi C., R. Estes, R. L. Lickteig, S. I. Yang, C. Craft, M. C. Mumby (1994). "Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits." J Biol Chem **269** (31): 20139-20148.

Khan N., F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad, H. Mukhtar (2006). "Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate." Cancer Res **66** (5): 2500-2505.

Kim H. S., M. C. Song, I. H. Kwak, T. J. Park, I. K. Lim (2003). "Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence." J Biol Chem **278** (39): 37497-37510.

Kiss A., B. Becsi, B. Kolozsvari, I. Komaromi, K. E. Kover, F. Erdodi (2013). "Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit protein phosphatase-1." FEBS J **280** (2): 612-626.

- Kiss A., B. Lontay, B. Becsi, L. Markasz, E. Olah, P. Gergely, F. Erdodi (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.
- Kita A., S. Matsunaga, A. Takai, H. Kataiwa, T. Wakimoto, N. Fusetani, M. Isobe, K. Miki (2002). "Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1." Structure **10** (5): 715-724.
- Kolozsvari B., E. Bako, B. Becsi, A. Kiss, A. Czikora, A. Toth, G. Vamosi, P. Gergely, F. Erdodi (2012). "Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase." Cardiovasc Res **96** (3): 494-503.
- Kwon Y. G., S. Y. Lee, Y. Choi, P. Greengard, A. C. Nairn (1997). "Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94** (6): 2168-2173.
- Li Y. M., J. E. Casida (1992). "Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A." Proc Natl Acad Sci U S A **89** (24): 11867-11870.
- Liedberg B., C. Nylander, I. Lundstrom (1995). "Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started." Biosens Bioelectron **10** (8): i-ix.
- Longin S., K. Zwaenepoel, E. Martens, J. V. Louis, E. Rondelez, J. Goris, V. Janssens (2008). "Spatial control of protein phosphatase 2A (de)methylation." Exp Cell Res **314** (1): 68-81.
- Lontay B., A. Kiss, P. Gergely, D. J. Hartshorne, F. Erdodi (2005). "Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells." Cell Signal **17** (10): 1265-1275.
- Lontay B., B. Pal, Z. Serfozo, A. Koszeghy, G. Szucs, Z. Rusznak, F. Erdodi (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.

- Lontay B., Z. Serfozo, P. Gergely, M. Ito, D. J. Hartshorne, F. Erdodi (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.
- Lopez F., C. Pichereaux, O. Burlet-Schiltz, L. Pradayrol, B. Monsarrat, J. P. Esteve (2003). "Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules." Proteomics **3** (4): 402-412.
- Luo Y., Y. J. Nie, H. R. Shi, Z. F. Ni, Q. Wang, J. Z. Wang, G. P. Liu (2013). "PTPA activates protein phosphatase-2A through reducing its phosphorylation at tyrosine-307 with upregulation of protein tyrosine phosphatase 1B." Biochim Biophys Acta **1833** (5): 1235-1243.
- Mansuy I. M., S. Shenolikar (2006). "Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory." Trends Neurosci **29** (12): 679-686.
- Mathe C., D. Beyer, F. Erdodi, Z. Serfozo, L. Szekvolgyi, G. Vasas, M. H. M, K. Jambrik, S. Gonda, A. Kiss, Z. M. Szigeti, G. Suranyi (2009). "Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets." Aquat Toxicol **92** (3): 122-130.
- Millward T. A., S. Zolnierowicz, B. A. Hemmings (1999). "Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A." Trends Biochem Sci **24** (5): 186-191.
- Moorhead G., R. W. MacKintosh, N. Morrice, T. Gallagher, C. MacKintosh (1994). "Purification of type 1 protein (serine/threonine) phosphatases by microcystin-Sepharose affinity chromatography." FEBS Lett **356** (1): 46-50.
- Moorhead G. B., L. Trinkle-Mulcahy, A. Ulke-Lemee (2007). "Emerging roles of nuclear protein phosphatases." Nat Rev Mol Cell Biol **8** (3): 234-244.
- Mumby M. (2007). "PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor." Cell **130** (1): 21-24.
- Muranyi A., F. Erdodi, M. Ito, P. Gergely, D. J. Hartshorne (1998). "Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets." Biochem J **330** (Pt 1): 225-231.
- Namboodiripad A. N., M. L. Jennings (1996). "Permeability characteristics of erythrocyte membrane to okadaic acid and calyculin A." Am J Physiol **270** (2 Pt 1): C449-456.

Nedelkov D., R. W. Nelson (2003). "Delineating protein-protein interactions via biomolecular interaction analysis-mass spectrometry." J Mol Recognit **16** (1): 9-14.

Nelson R. W., J. W. Jarvik, B. E. Taillon, K. A. Tubbs (1999). "BIA/MS of epitope-tagged peptides directly from E. coli lysate: multiplex detection and protein identification at low-femtomole to subfemtomole levels." Anal Chem **71** (14): 2858-2865.

Qin J., H. G. Chen, Q. Yan, M. Deng, J. Liu, S. Doerge, W. Ma, Z. Dong, D. W. Li (2008). "Protein phosphatase-2A is a target of epigallocatechin-3-gallate and modulates p53-Bak apoptotic pathway." Cancer Res **68** (11): 4150-4162.

Runnegar M., N. Berndt, N. Kaplowitz (1995). "Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters." Toxicol Appl Pharmacol **134** (2): 264-272.

Rusnak F., P. Mertz (2000). "Calcineurin: form and function." Physiol Rev **80** (4): 1483-1521.

Sheppeck J. E., 2nd, C. M. Gauss, A. R. Chamberlin (1997). "Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins." Bioorg Med Chem **5** (9): 1739-1750.

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

Shimizu H., M. Ito, M. Miyahara, K. Ichikawa, S. Okubo, T. Konishi, M. Naka, T. Tanaka, K. Hirano, D. J. Hartshorne, et al. (1994). "Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem **269** (48): 30407-30411.

Stenlund P., A. Frostell-Karlsson, O. P. Karlsson (2006). "Studies of small molecule interactions with protein phosphatases using biosensor technology." Anal Biochem **353** (2): 217-225.

Stralfors P., A. Hiraga, P. Cohen (1985). "The protein phosphatases involved in cellular regulation. Purification and characterisation of the glycogen-bound form of protein phosphatase-1 from rabbit skeletal muscle." Eur J Biochem **149** (2): 295-303.

Takai A., C. Bialojan, M. Troschka, J. C. Ruegg (1987). "Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin." FEBS Lett **217** (1): 81-84.

Tang P. M., J. A. Bondor, K. M. Swiderek, A. A. DePaoli-Roach (1991). "Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase." J Biol Chem **266** (24): 15782-15789.

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

Toth A., E. Kiss, P. Gergely, M. P. Walsh, D. J. Hartshorne, F. Erdodi (2000a). "Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin." FEBS Lett **484** (2): 113-117.

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

Visser N. F., A. Scholten, R. H. van den Heuvel, A. J. Heck (2007). "Surface-plasmon-resonance-based chemical proteomics: efficient specific extraction and semiquantitative identification of cyclic nucleotide-binding proteins from cellular lysates by using a combination of surface plasmon resonance, sequential elution and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Chembiochem **8** (3): 298-305.

Wiegand C., S. Pflugmacher (2005). "Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review." Toxicol Appl Pharmacol **203** (3): 201-218.

Wroblewski K., R. Muhandiram, A. Chakrabartty, A. Bennick (2001). "The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds." Eur J Biochem **268** (16): 4384-4397.

Wu Y., F. Erdodi, A. Muranyi, K. D. Nullmeyer, R. M. Lynch, D. J. Hartshorne (2003). "Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells." J Muscle Res Cell Motil **24** (8): 499-511.

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

Xu Y., Y. Chen, P. Zhang, P. D. Jeffrey, Y. Shi (2008). "Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation." Mol Cell **31** (6): 873-885.

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

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

Zhang Z., G. Bai, M. Shima, S. Zhao, M. Nagao, E. Y. Lee (1993). "Expression and characterization of rat protein phosphatases-1 alpha, -1 gamma 1, -1 gamma 2, and -1 delta." Arch Biochem Biophys **303** (2): 402-406.

Zhao W., Y. Wang, W. Hao, M. Zhao, S. Peng "In vitro inhibition of fatty acid synthase by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose plays a vital role in anti-tumour activity." Biochem Biophys Res Commun **445** (2): 346-351.

Tárgyszavak

Felületi plazmonrezonancia	Surface Plasmon Resonance
Szenzor chip CM5, SA, L1	Sensor Chip CM5, SA, L1
Lipid micella immobilizálás	Immobilization of lipid micelle
Protein foszfatáz inhibitorok	Protein phosphatase inhibitors
Protein foszfatáz-1 (PP1)	Protein phosphatase-1(PP1)
Protein foszfatáz-2A (PP2A)	Protein phosphatase-2A (PP2A)
Protein foszfatáz kölcsönható partnerek	Protein phosphatase interacting partners
Protein foszfatáz aktivitás	Protein phosphatase activity
Biotinilált mikrocisztin	Biotinylated microcystin
Tannin	Tannin

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Erdődi Ferenc professzor úrnak, aki útmutatásaival, tanácsaival és hasznos ötleteivel irányította PhD munkámat az évek során.

Köszönettel tartozom Dr. Gergely Pál egykori és Dr. Virág László jelenlegi intézetigazgató uraknak, hogy munkámat támogatták és biztosították számomra a megfelelő kutatási feltételeket a Debreceni Egyetem ÁOK Orvosi Vegytani Intézetében.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Köszönöm munkacsoportunk minden tagjának (Dr. Kiss Andrea, Dr. Lontay Beáta, Dedinszki Dóra, Bátori Róbert, Sipos Adrienn) a kísérletes munkáim során nyújtott segítségét és türelmét. Köszönöm Dr. Németh Árpádnénak és Docsa Andreának a mindennapi munkában nyújtott segítségét.

Hálás köszönettel tartozom Feleségemnek és Kislányomnak, akik türelmükkel és szeretetükkel mindvégig mellettem álltak, valamint Szüleimnek, akik támogattak és ösztönöztek munkám során.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 számú projekt támogatta. A kísérletes munka kivitelezéséhez a 2012TKI630, a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, illetve a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt nyújtott támogatást. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



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

Jelölt: Bécsi Bálint

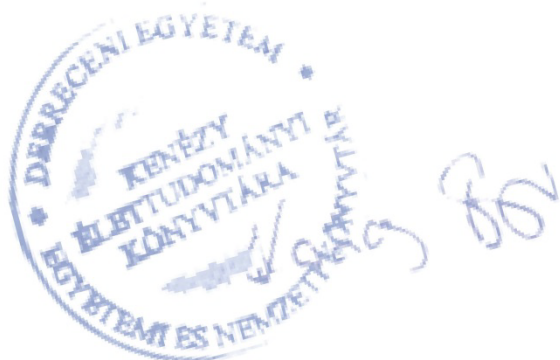
Neptun kód: P8Q2RR

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10034521

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

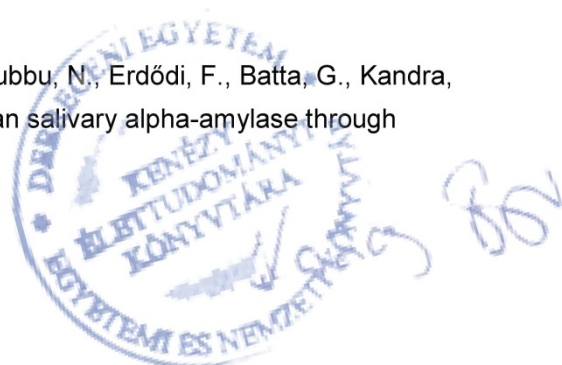
1. **Bécsi, B.**, Kiss, A., Erdődi, F.: Interaction of protein phosphatase inhibitors with membrane lipids assessed by surface plasmon resonance based binding technique.
Chem. Phys. Lipids. 183C, 68-76, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.05.009>
IF:2.147 (2012)
2. **Bécsi, B.**, 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- β -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., Czíkora, 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. Czíkora, 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., Zajácz, 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



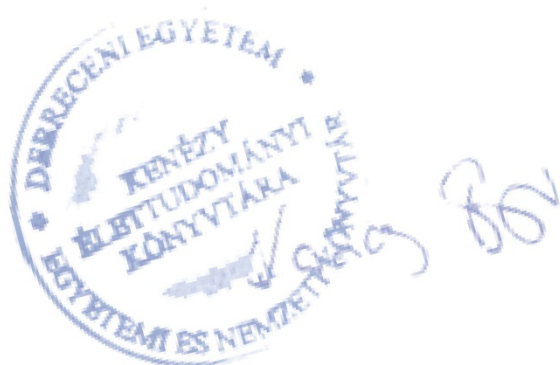
9. Kiss, A., Lontay, B., **Bécsi, B.**, Márkász, L., Oláh, É., Gergely, P., Erdődi, F.: Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: Its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell. Signal.* 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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.07.24



Függelék

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások

Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Erdődi Ferenc: Fehérje-fehérje és fehérje-ligand kölcsönhatások kvantitatív jellemzése felületi plazmonrezonancia elvén alapuló mérési módszerrel

38. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2008. május 20-23.

Bálint Bécsi: Interaction of protein phosphatase and endothelial nitric oxide synthase inhibitors with lipid micelles from the membrane of different tissues.

PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, Hungary, may 31st - June 1st, 2010

Bálint Bécsi: Application of SPR technique to characterize the interaction of membrane-permeable enzyme inhibitors with lipid micelles

PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, Debrecen, Hungary, June 6-7, 2011

Bálint Bécsi: Application of SPR technique to characterize the interaction of membrane-permeable enzyme inhibitors with lipid micelles

Signaling pathway in cancer biology, Galyatető, Hungary, May 27-29, 2011

Bécsi Bálint, Gergely Pál, Erdődi Ferenc: Membrán-permeábilis enziminhibitorok különböző szövetekből kivont lipidekkel való kölcsönhatásának vizsgálata felületi plazmon-rezonancia (SPR) elvén alapuló mérési technikával

MBKE 2011. Vándorgyűlés, Pécs, 2011. augusztus 28-31.

Bálint Bécsi: "Fishing" of protein phosphatase interacting partners from cell lysate by Biacore technology

Signaling pathway in cancer biology, Egerszalók, Hungary, May 24-26, 2013

Poszterek

Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Docsa Tibor, Gergely P., Erdődi Ferenc: Biomolekuláris kölcsönhatások tanulmányozása Biacore készülékkel

38. Membrán-transzport Konferencia, 2008. május 20-23., Sümeg

Bécsi Bálint, Kiss Andrea, Docsa T., Gergely P., Erdődi Ferenc: Biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálata Biacore-3000 készülékkel

Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése, 2008. aug.31.–szept.3., Szeged

Bécsi Bálint, Erdődi Ferenc: Protein foszfatáz inhibitorok membrán asszociációjának vizsgálata felületi plazmon-rezonancia elvén alapuló mérési technikával

40. Membrán-transzport Konferencia, 2010. május 18-21., Sümeg

Bécsi Bálint, Bátori Róbert, Dedinszki Dóra, Sipos Adrienn, Lontay Beáta, Erdődi Ferenc: Protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék izolálása Bioacore kötődési technikával

42. Membrán-Transzport Konferencia, 2012. május 15-18., Sümeg

Bécsi Bálint, Bátori Róbert, Dedinszki Dóra, Lontay Beáta, Erdődi Ferenc: Protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék azonosítása sejtlyázumból biacore kötődési technika alkalmazásával

43. Membrán-Transzport Konferencia, 2013. május 21-24., Sümeg

Bécsi Bálint, Dedinszki, Dóra, Lontay Beáta, Erdődi Ferenc: Identification of protein phosphatase interacting partner séfrom cell lysates by surface plasmon resonance based binding technique using biotin-mycrocystin as capturing molecule

Europhosphatase 2013 – Protein Phosphatases in Health and Disease, July 7-12, 2013, Rehovot, Israel

Bálint Bécsi, Dóra Dedinszki, Beáta Lontay, Ferenc Erdődi: Identification of protein phosphatase interacting proteins from normal and UVA-irradiated HaCaT cell lysates by surface plasmon resonance based binding technique

Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 2014. augusztus 24-27., Debrecen