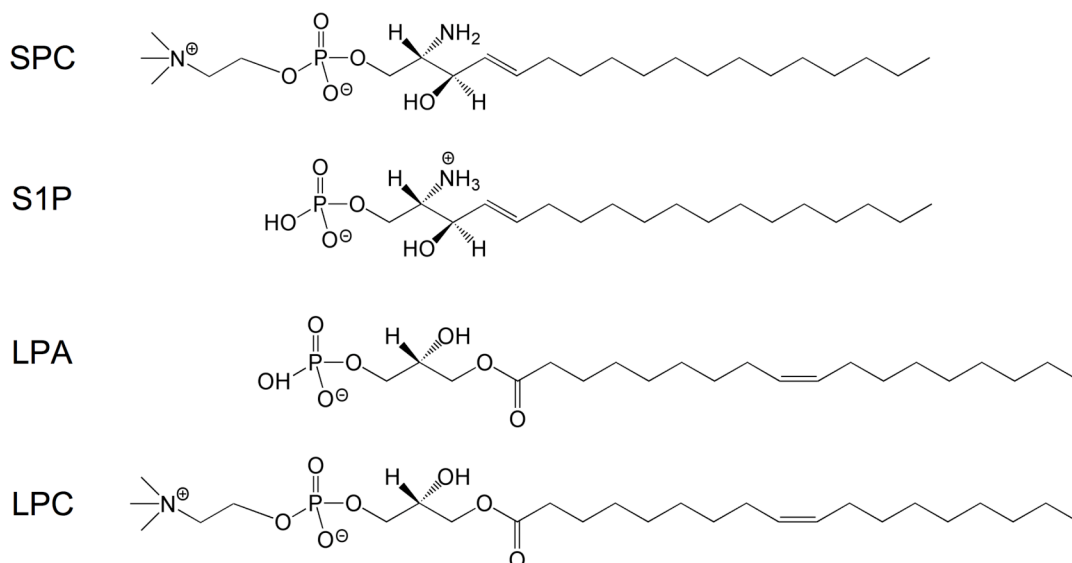


Lizofosfolipid jelátvivő molekulák - egy új mediátor család a jelátvitelben

Az elmúlt mintegy fél évszázadban megjelent ugyan néhány szakcikk egyes lizofosfolipidek - elsősorban az lizofoszfátidsav (LPA) - érrendszeri hatásairól, mégis ezeket a vegyületeket csak mint a lipid-anyagcsere közttermékeit tartották számon. Körülbelül két évtizede azonban felismerték, hogy a glicerolipid LPA és a vele rokonítható szerkezetű szfingolipid szfingozin-1-foszfát (S1P) a sejteletani folyamatokat közvetlenül meghatározó jelpályákra hatnak, ezáltal befolyásolva a sejtek proliferációját, apoptózisát és differenciációját. Kezdetben az LPA-t mint elsődleges, a S1P-t és közvetlen metabolitjait, a szfingozint (Sph) és a szfingozil-foszfórilkolin (SPC) mint másodlagos hírvivőt könyvelték el. A 90-es évek második felében azonosították az EDG receptor családot, mint az LPA és S1P specifikus plazma-membrán receptorait - innentől kezdve a kutatók többsége a lizofosfolipidek minden élettani és patológiás hatását ezen receptorok aktiválásának tulajdonította. Az utóbbi évtizedben azonban világossá vált, hogy ennél sokkal komplexebb a kép - a kétségtelenül fontos receptorok által közvetített hatások mellett sejtelettanilag szintén nagyon jelentősek ezen lipidek intracelluláris aktivitásai is. A pályázat témavezetője részt vett korábban az LPA és S1P heptahelikális receptorainak azonosításában és vizsgálatában, szintúgy később az intracelluláris hatáspontú jelátvitel bizonyításában, elsősorban a Ca²⁺-jelátvitel tekintetében. Az elsődleges hírvivő hatáshoz azonosított plazmamembrán-receptorokkal szemben ismeretlenek voltak azok a jelátviteli célfehérjék, amelyek a sejten belüli másodlagos hírvivő-jellegű hatásokat közvetítették. Ezen fehérjék - legalább részbeni - azonosítása és a kölcsönhatások biokémiai jellemzése volt a jelen pályázat fő célkitűzése.

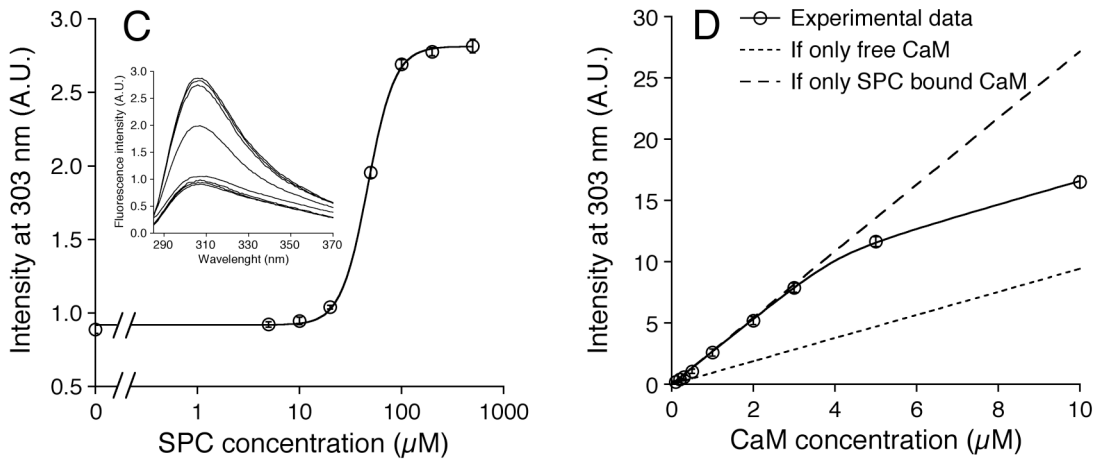
Intracelluláris célfehérjék azonosítása - kalmodulin

Előkísérleteink eredményei alapján feltételeztük, hogy a szfingolipid mediátorok, vagy azok valamelyike, kölcsönhathat a kalmodulinnal (CaM). A szerkezetileg és funkcionálisan rokon lizofosfolipidek közül szisztematikusan vizsgáltuk az S1P, az LPA, az SPC és kiegészítésként a lizofoszfátidil-kolin (LPC) hatását. Ezen lipidek szerkezetét mutatja az alábbi ábra:



Az S1P és az LPA lipid foszfátok, az SPC és LPC lipid-foszfokolinok, ráadásul ugyanaz az enzim képes a kolincsoport lehasításával az S1P-t, illetve az LPA-t előállítani SPC-ből, illetve LPC-ből (mely aktivitás az LPA elsődleges forrása biológiai folyadékokban). Az LPA, S1P és SPC részlegesen átfedő hatás-spektrumú fiziológiailag nagyon fontos lipid mediátorok, míg az LPC ebből a szempontból meglehetősen inert, jelátviteli aktivitása minimális, inkább az LPA előanyagaként jelentős. Ez a négy molekula tehát ideális csoportot képezett vizsgálatainkhoz.

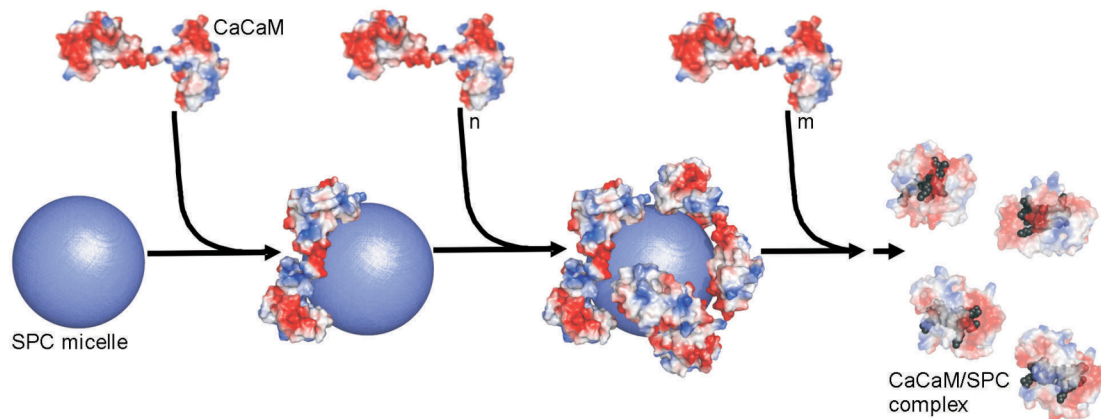
Fluoreszcencia spektroszkópai és felületi plazmon rezonancia spektroszkópai (Biacore) technikákkal kimutattuk, hogy a lizofosfolipid mediátor család tagjai közül az SPC szelektíven kölcsönhat a CaM-nal (*Kovács and Liliom, Biochem J 2008*). A kölcsönhatás szelektivitása nem csak egyedileg vizsgált lizofosfolipidek esetén nyilvánul meg, de megfigyelhető lizofosfolipid keverékekben, illetve különböző összetételű liposzómákban, amelyekhez az adott lizofosfolipidünket adalékoltuk. A kölcsönhatás biokémiai leírása során azt tapasztaltuk, hogy alacsony SPC koncentrációknál nem valósul meg a kölcsönhatás, de a koncentráció emelésével amint elérjük a lizofosfolipid kritikus micella koncentrációját (CMC) azonnal kialakul a komplex. Ebből arra következtettünk, hogy a CaM nem egyedi lipid molekulával, hanem azok asszociátumaival lép kölcsönhatásra, amely feltevésünket un. reverz titrációs kísérletben igazoltuk:



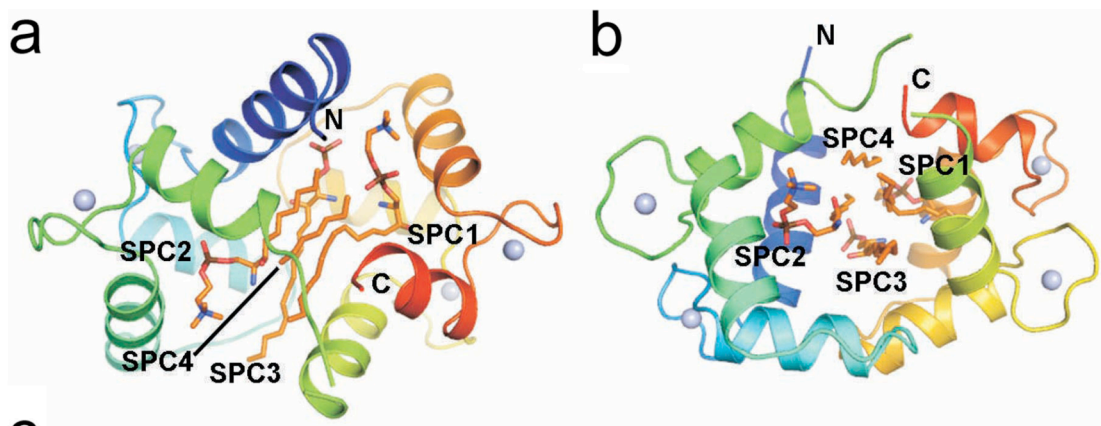
A reverz titrálás adatait a legegyszerűbb 1:1 kötési modellhez illesztve már sejthető volt, hogy a kötődés igen szoros, alacsony K_d értékkel jellemezhető, amely becslésünket később stopped-flow (*Kovács et al., J Biol Chem 2010*) és izotermális titrációs kalorimetria (*Kovács et al., FASEB J 2010*) kísérletekkel igazoltuk. Ugyanezekben a munkákban kimutattuk, hogy az SPC a CaM kompetitív inhibitora (*Kovács and Liliom, Biochem J 2008, Kovács et al., J Biol Chem 2010*), valamint meghatároztuk a kötődés mechanizmusát és a kialakuló komplex kristályszerkezetét (*Kovács et al., FASEB J 2010*).

Eredményeink túlmutatnak azon a tényen, hogy azonosítottuk a lizofosfolipid mediátorok közül az SPC első intracelluláris célfehérjéjét. A CaM központi szerepet játszik a sejtek Ca^{2+} -jelátviteli folyamataiban, minden sejt elsődleges Ca^{2+} -szenzora és a kalcium-hatás fő közvetítője, amely több, mint negyven célenzim aktivitását szabályozza. Eddig úgy gondolták, hogy a CaM aktivitását egyedül Ca^{2+} -telítettsége határozza meg. Az SPC az első jelátviteli molekula, amely képes a CaM aktivitását a

Ca²⁺-ionoktól függetlenül szabályozni, a CaM endogén gátlószerének tekinthető. Természetesen a folyamat *in vivo* szerepét további kísérletekben kell felderíteni, de ebből a szempontból nagyon érdekes az a megfigyelésünk, hogy az SPC gátolja mind az apoCaM, mind Ca²⁺+CaM aktivitását (Kovács and Liliom, *Biochem J* 2008). Másik érdekes eredményünk, hogy a CaM-SPC komplex képződése kétlépcsős folyamat: a fehérje először nagy affinitással kötődik a lizofosfolipid micellához, majd egy konformációs átalakulás figyelhető meg, aminek következtében a CaM néhány lipid molekulát közbezárva ún. zárt konformációt vesz fel:



Ezt a zárt konformációs formát sikeresen kristályosítottuk - a megoldott szerkezetben a CaM két globuláris fele egymásra visszahajolva 4 db SPC molekulát zár közre:



Külön érdekessége a CaM-SPC komplex szerkezetnek, hogy a CaM peptid-gerince majdnem pontosan ugyanazt a konformációt vesz fel, mint amit a CaM-trifluoperazin (a CaM klasszikus szintetikus antagonistája) vagy a CaM-targetpeptid térszerkezetekben és a 4 SPC ugyanazt a pozíciót foglalja el, mint amit a bázikus amfiptikus alfa-hélix targetpeptidek, mint például a miozin-könnyűlánc-kináz peptidje (Kovács *et al.*, *FASEB J* 2010), amely megfigyelések mechanisztikus magyarázatul szolgálnak a célezimek esetén megfigyelt kompetitív gátlásra (pl kalcineurin aktiválásának gátlása: Kovács and Liliom, *Biochem J* 2008).

Kísérleteinket a pályázat időszaka alatt három irányban vittük tovább a CaM lizofosfolipid kölcsönhatás vizsgálatában. Egyrészt a CaM-kötődési esszét végigmértük az S1P és SPC szfingolipid metabolikus rokonaira is, úgymint a Sph,

ceramid, ceramid-1-foszfát és szfingomielin. Megállapítottuk, hogy az összes szfingolipid alapvázát szolgáltató Sph nagyon hasonló módon lép kölcsönhatásba a CaM-nal, mint az SPC, ugyanúgy szoros kötést alakít ki vele, de szintén csak a CMC feletti koncentrációban. Ezeket az eredményeinket a Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlésén fogjuk ismertetni.

Vizsgáltuk továbbá a CaM-nal rokon un. EF-Hand szerkezetű fehérjék lehetséges lizofoszfolipid-kötését és megállapítottuk, hogy a a jelátvitelben szintén fontos szerepet betöltő S100A4 (kötőpartnerei az apoptózis szabályozásában kulcsszereplő p53 fehérje, a sejtmotilitásért felelős nem-izom miozin-IIA (myo2A) és extracellulárisan az annexin-II) szintén szelektíven köti az aggregált SPC-t (*Kiss B, Kovács E, Liliom K, Nyitray L: Az S100A4 metasztázis fehérje protein-lipid kölcsönhatásainak szerkezet-funkció vizsgálata, Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest*).

Harmadik kutatási irányunk a CaM-SPC kölcsönhatás lehetséges szerepét vizsgálta a rianodin-receptor (RyR1)-általi intracelluláris kalcium mobilizációra. Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy az SPC közvetlenül intracellulárisan hatva képes mobilizálni az endoplazmás retikulumban tárolt Ca²⁺-ionokat, valamint publikált eredmények szerint az SPC befolyásolja a RyR1 működését. Szintén ismert, hogy a RyR1 aktivitásának egyik fő szabályozója a CaM és a RyR1 felületén mind az apoCaM, mind a Ca²⁺-CaM számára van kötőhely. Logikus volt megvizsgálunk, hogy mia hozzájárulása az SPC-CaM kölcsönhatásnak a RyR1 aktivitásának szabályozásában. Ezeket a kísérleteket kollaborációban végeztük, amihez Kovács Erika PhD hallgatóm 2009-ben EMBO Short-term Fellowship támogatással két hónapot töltött prof Gerhard Meissner laboratóriumában (Department of Biochemistry and Biophysics, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA). Eredményeink alátámasztják, hogy az SPC-CaM kölcsönhatásnak szerepe van a csatorna szabályozásában (*E. Kovacs, Le Xu, D. A. Pasek, K. Liliom, and G. Meissner (2010) Regulation of ryanodine receptors by sphingosylphosphorylcholine: involvement of both calmodulin-dependent and -independent mechanisms, The FEBS Journal, publikálásra beküldve*), azonban a pontos mechanizmus tisztázásához további kísérletek kellenek.

Extracelluláris célfehérjék azonosítása - beta2-mikroglobulin

A lizofoszfolipid-fehérje kölcsönhatások szelektivitásának tanulmányozására szisztematikusan vizsgáltunk tipikus fehérje motívumokat, elsősorban olyanokat, amelyek fehérje-fehérje vagy fehérje-lipid kölcsönhatásokban vesznek részt. Az egyik kiválasztott un. PH-domén tartalmú fehérjék vizsgálatát a 61501 pályázat továbbvitelének tekinthető jelenleg aktív 82092 pályázatomban végezzük. Egy korábbi jelöltünk viszont az un. immunglobulin-fold típuspéldának tekinthető beta-2-mikroglobulin (b2M) volt. A lizofoszfolipid-kötés konformációs szelektivitásának tanulmányozására jó ellentpontonk kínálkozott ez a csupa béta-lemez szerkezetű kis globuláris fehérje a szinte csak alfa-héliceket tartalmazó CaM-hoz képest. Kimutattuk, hogy a b2M, amely vesedialízises betegekben mozgásszervi problémákat okozó amiloid lerakódásokat képez, szelektíven kölcsönhat az aggregált LPA-val, melynek hatására az egyébként stabil fehérje amiloidogén konformációt vesz fel (*Pál-Gábor et al., Biochemistry 2009*). Ezen eredményünk jelentőségét az adja, hogy

nehezen érthető, miként, milyen tényezők hatására képez amiloid lerakódásokat a b2M, amely egyébként a betegekben előforduló már nagyon magas koncentrációt jóval meghaladó töménységben sem formál amiloidot fiziológias körülmények között in vitro. Megmutattuk, hogy az LPA micellákhoz kötődve fellazul a fehérje szerkezete, un. molten globula konformációt vesz fel, amely már hajlamos amiloid szálat képezni fiziológias pH-n és sókoncentrációban (*Pál-Gábor et al., Biochemistry 2009*). Miután a vesedialízis során a vérlemezkék és más sejtek véralkotók aktiválódása miatt az LPA szintje ugrásszerűen megemelkedik, hisszük, hogy az általunk felismert mechanizmus hozzájárul az évek alatt súlyosbodó amiloid lerakódások létrejöttéhez. Jelenleg vizsgáljuk a kötődés mechanizmusának részleteit, amely eredményeinket várhatóan ez év második felében publikálhatjuk.

A CaM-SPC és a b2M-LPA kölcsönhatások a lipid-fehérje kötődés újfajta modelljeinek tekinthetők, amelynek során a fehérje vagy fehérje-modul először egy specifikus lizofosfolipid-felülettel reagál, elsősorban poláros kölcsönhatások közvetítésével, majd kialakulhat egy szorosabb lipid-fehérje komplex. Az ilyen típusú kötődések jelentősek lehetnek jelátviteli folyamatokban, ahol az adott lizofosfolipid lokális keletkezése aktiválódó foszfolipázok által biztosított (ezeket a helyileg és időlegesen lizofosfolipidben feldúsult membrán-felszíneket modellezi in vitro a micella) és így befolyást gyakorolhat a moduláris felépítésű jelátviteli fehérjék membránhoz való, vagy a fehérjemodulok egymás közötti kötődésére. Ezeket a lehetőségeket vizsgáljuk a munkánk továbbvitelének tekinthető 82092 aktív OTKA pályázatomban.

Az S1P plazmamembrán-transzportjának azonosítása

Az S1P transzportmechanizmusának vizsgálata vezikuláris transzportmérésekkel és radioaktív szubsztrát-jelöléssel zajlott ABCA1, illetve többféle ABCC aktív transzportert expresszáló Sf9 membrán preparátumokon. Előzetes eredményeinket hazai, valamint nemzetközi konferencián poszter formában ismertettük. Kimutattuk hogy sejtípustól függően mind az ABCA1, mind az ABCC1 képes részlegesen átjuttatni az S1P-t a plazmamembránon, de ezeket az eredményeket kísérleteink befejezése előtt a nemzetközi szakirodalomban más kutatócsoportok közölték. A pályázati időszak végén figyelmünk a Sph, S1P, SPC és LPA szállítófehérjéinek azonosítása felé fordult, biztató eredményekkel egyes lipoproteinek szelektív kötési képességeinek vizsgálatában.

A pályázat ideje alatt a pályázat témájában született publikációink

Kovacs E, Harmat V, Tóth J, Vértessy BG, Módos K, Kardos J, **Liliom K**. Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions. *FASEB J*. 2010 Jun 14. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20522785. **IF: 6.401** (2009)

Kovacs E, Tóth J, Vértessy BG, **Liliom K**. Dissociation of calmodulin-target peptide complexes by the lipid mediator sphingosylphosphorylcholine: implications in calcium signaling. *J Biol Chem*. 2010 Jan 15;285(3):1799-808. PubMed PMID: 19910470. **IF: 5.328** (2009)

Pál-Gábor H, Gombos L, Micsonai A, Kovács E, Petrik E, Kovács J, Gráf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y, **Liliom K**, Kardos J. Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of beta(2)-microglobulin in vitro under physiological conditions. *Biochemistry*. 2009; 48(24):5689-99. PubMed PMID: 19432419. **IF: 3.226** (2009)

Kovacs E, **Liliom K**. Sphingosylphosphorylcholine as a novel calmodulin inhibitor. *Biochem J*. 2008; 410(2):427-37. PubMed PMID: 17979830. **IF: 4.371**

A pályázat ideje alatt nem a pályázat témájában született publikációink

Kovacs E, Tompa P, **Liliom K**, Kalmar L. Dual coding in alternative reading frames correlates with intrinsic protein disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Mar 23;107(12):5429-34. PubMed PMID: 20212158. **IF: 9.432** (2009)

Lankalapalli RS, Baksa A, **Liliom K**, Bittman R. Synthesis and Properties of a Photoactivatable Analogue of Psychosine (beta-Galactosylsphingosine). *ChemMedChem*. 2010 May 3;5(5):682-6. PubMed PMID: 20209561. **IF: 3.232** (2009)

Beck Z, Balogh A, Kis A, Izsépi E, Cervenak L, László G, Bíró A, **Liliom K**, Mocsár G, Vámosi G, Füst G, Matko J. New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. *J Lipid Res*. 2010 Feb;51(2):286-96. PubMed PMID: 19654424. **IF: 4.917** (2009)

Fujiwara Y, Osborne DA, Walker MD, Wang DA, Bautista DA, **Liliom K**, Van Brocklyn JR, Parrill AL, Tigyi G. Identification of the hydrophobic ligand binding pocket of the S1P1 receptor. *J Biol Chem*. 2007; 282(4):2374-85. PubMed PMID: 17114791. **IF: 5.581**

Liliom K, Tsukahara T, Tsukahara R, Zelman-Femiak M, Swiezewska E, Tigyi G. Farnesyl phosphates are endogenous ligands of lysophosphatidic acid receptors: inhibition of LPA GPCR and activation of PPARs. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761(12):1506-14. PubMed PMID: 17092771. **IF: 3.117**