

Szinergia I összegző úrlap

Az áttétképzést és gyulladást fokozó S100A4 fehérje működése és gátlása

Fókuszpont(ok):

Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladáshoz és daganatos megbetegedésekben

NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében

Részvevők:

1. **Bodor Andrea**, PhD, egyetemi adjunktus
ELTE TTK Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium, abodor@chem.elte.hu
2. **Kalmár Lajos**, PhD, tudományos főmunkatárs
MTA-TTK Enzimológiai Intézet, kalmar.lajos@ttk.mta.hu
3. **Nyitray László**, DSc, egyetemi tanár
ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, nyitray@ttk.elte.hu
4. **Pál Gábor**, PhD, egyetemi docens
ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, gabor.pal@ttk.elte.hu

A MEDinPROt támogatást megköszönő publikációk:

1. **Biri B, Kiss B, Király R, Schlosser G, Láng O, Kóhidai L, Fésüs L, and Nyitray L.** *Metastasis-associated S100A4 is a specific amine donor and an activity-independent binding partner of transglutaminase-2.* Biochem J., Oct 20, 2015, ; DOI: 10.1042/BJ20150843

(Jellemeztük az S100A4-TG2 komplexet, valamint megmutattuk, hogy a komplex jelentősen fokozza egy epiteliális eredetű karcinoma sejtvonal adhézióját az extracelluláris mátrixhoz. A komplex szerkezeti vizsgálata, amely közvetlenül kapcsolódik a szinergiához, jelenleg folyik.)
2. **Gógl G, Alexa A, Kiss B, Katona K, Kovács M, Reményi A, Nyitray L.** *Structural basis of RSK1 inhibition by S100B: modulation of the ERK signaling cascade in a calcium-dependent way.* J. Biol. Chem., in press

(A melanomákban túltermelő S100B és RSK1 alkotta komplexet szerkezetét és funkcionális hatását jellemeztük. A röntgenkristallográfiai, NMR és in silico szerkezetvizsgálat is kapcsolódik a szinergiához.)
3. **Kiss B, Kalmár J, Nyitray L, Pál G.** *Isoform-selectivity of S100A4-induced non-muscle myosin II filament disassembly is synergistically determined by structural elements in the tail region.* J. Mol. Biol. under review

(A szinergia programunk egyik kulcskérdésére adtunk választ: feltártuk a szerkezeti hátterét hogy az S100A4 miért izoforma-specifikus módon hat a nem-izom miozin filamentumok szétesésére.)

4. **Pálfy Gy, Kiss B, Nyitray L, Bodor A.** *Changes in the dynamics of S100A4 upon a non-muscle myosin binding.* Chemistry, before submission

(A szinergia programhoz szintén közvetlenül kapcsolódó publikáció, amelyben a S100A4-NM2A kölcsönhatás dinamikai tulajdonságait vizsgáltuk a fókuszpont NMR spektroszkópiával.)

- 1) Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódott az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez (*max. 300 szó*).

Együttműködésünk két fókuszponthoz kapcsolódott: „**Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladáshoz és daganatos megbetegedésekben**” valamint „**NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében**”.

Az S100A4/metasztazin és az S100B a fehérjecsalád két intenzíven kutatott tagja. Fiziológiás és patológiás funkciói a sejtek migrációs, inváziós viselkedésével kapcsolatosak. Fontos szereplők rosszindulatú daganatok áttétképződésében és krónikus gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban. Az S100A4 motilitásban betöltött funkciója során a nem-izom miozin 2A (NM2A) nehézlánc C-terminális végéhez kötődik. Ezzel a fehérjekomplexszel végeztük vizsgálataink zömét. Az S100A4 további fontos intracelluláris kölcsönható partnerei a p53 tumor szupresszor fehérje és a szöveti transzglutamináz-2 enzim. Egyes közlemények szerint ezen komplexek létrejötte elősegítheti a rákos sejtek túlélését (p53) illetve migrációját (TG2). Az S100B és a RSK1 MAPKAPK fehérje kölcsönhatását melanóma sejtekben írták le. A program során ennek a kölcsönhatásnak a feltárása is célkeresztbe került.

Ebben a pályázatban elsősorban arra vállalkoztunk, hogy biofizikai mérések, szerkezeti bioinformatikai elemzések, NMR spektroszkópia, valamint irányított fehérjeevolúció kombinálásával az említett komplexeknél feltárjuk a komplexképzés molekuláris történéseit, a komplex stabilitását biztosító kölcsönhatásokat. Erre alapozva a jövőben hatékony antagonistá peptideket fejlesztünk, amelyek az S100 fehérjék kölcsönhatásait blokkolva terápiás hatást lehet elérni.

- 2) Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eredményeit (*max. 300 szó*).

i) Feltárnunk az S100A4-NM2A izoforma-specifikitásának szerkezeti hátterét. Fág-bemutatóval elvégzett paralóg-szkennelési kísérletekből kiderült, hogy egyetlen aminosavnak van kitüntetett szerepe: az erősen kötődő NM2A és NM2C formánál Ala, a gyengébben kötődő (ezért a miozin filamentumra nem ható) NM2B-nél Asp található. Az izoformák között leginkább különböző, rendezetlen szerkezetű „farokvég” viszont csak kissé járul hozzá az affinitásbeli különbségekhez. Kiméra konstrukciókkal megmutattuk, hogy a miozin lineáris

kötőrégiójának egyes szerkezeti/funkcionális elemei közötti szinergia szükséges az NM2A (és NM2C) filamentumok szétzilálásához. (1. publ.)

ii) NMR vizsgálataink alapján az NM2A kötőrigó apo formában rendezetlen szerkezetű, de az S100A4 felszínén kialakuló hélix tranziens módon feltekeredik. Az Ca^{2+} - S100A4 és az NM2A lineáris kötőmotívummal alkotott komplex NMR tulajdonságait összevetve először sikerült rámutatnunk azokra a szerkezeti dinamikai különbségekre, elsősorban a komplexen belül az S100A4 belső mobilitásának lokális csökkenésére, ami felelős lehet a komplex extrém módon (négy nagyságrenddel) megnövekedett Ca^{2+} -affinitásáért. Ez utóbbi jelenség alapvetően befolyásolhatja az S100A4 fiziológiás működését, melyet inkább egy, a Ca-szignál kinetikai lefutásától függő „finombeállító” fehérjeként, mint egy „on-off” kapcsolóként lehet leírni (3. publ.).

iii) Az S100A4 és a TG2 kölcsönhatást jellemeztük, s kiderítettük, hogy az S100A4 amin-donorja lehet a transzglutamináz enzimnek, azonkívül – s a tumorbiológiai szerep szempontjából ez a fontosabb – az S100A4 a TG2 enzimaktivitásától függetlenül az utóbbit „nyitott” konformációban stabilizálja, s a komplex jelentősen fokozza egyes tumorsejtek adhézióját. (2. publ.)

iv) Az S100B és a MAPKAP-kináz RSK1 kölcsönhatását is jellemeztük. Kiderítettük, hogy az S100B kettős gátlást gyakorol az RSK1-re: megakadályozza az akitváló-kináz (ERK1/2) kötődését és gátolja a kináz intramolekuláris foszforiláción keresztüli aktiválását is. Pontosítottuk az S100B-hez kötődő lineáris motívumot (az RSK1 C-terminális kináz doménjének autoinhibitor hélice és a MAPK dokkoló peptid), meghatároztuk a kötőpeptiddel alkotott „fuzzy” komplex(ek) kristályszerkezetét, valamint SAXS és részben NMR mérések segítségével információhoz jutottunk a tényleges oldatszerkezetről is. Gyors-kinetikai mérésekkel modellt állítottunk fel a komplex kialakulásáról (4. publ.)

3) Értékeljék és véleményezzék közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) (*max. 200 szó*).

A szinergia program keretében hármféle módszertani tudással és megközelítéssel kezdünk vizsgálni egy tumorbiológiai szempontból fontos fehérjecsalád kölcsönhatásait. PG in vitro evolúciós módszertanát sikerrel adaptáltuk a megcélzott PPI-k tanulmányozása során. A kölcsönhatások termodinamikai, kinetikai analíziséből levont következtetéseket szerkezeti alapon, szerkezeti módszerekkel tudtuk alátámasztani. Az in silico szerkezeti szimulációk illetve az NMR szerkezetvizsgálatok terén KL és BA szakismeretere támaszkodhattunk. A közös „brainstorming”-ok új ötletekhez, kísérletek megtervezéséhez, az eredmények több szempontból való értékelésében vezettek. A már befejezett projektelemeken túl felvetődött olyan evolúciós projekt körvonala is, amely segítségével PPI-k szerkezeti elemeinek ko-evolúciójára lehetne fényt deríteni.

A legfontosabb „szinergiaelemnek” a három (és fél) szerkezeti megközelítés – röntgenkristallográfia (NyL), NMR (BA), modellezés (KL) és az in vitro evolúciós módszerek adta szekvencia sokaságok előállítása – közös alkalmazását tekintjük. Az

„egymásra hatás” ezen elemét felismerve, a szerkezeti biológiai megközelítések disszeminálása céljából sikeres „teadélutánokat” szerveztünk, ahol kötetlen szakmai eszmecsere folyt a különböző érdeklődésű (elsősorban MEDinPROT pályázat nyertes) kollégák között. Javasoljuk hasonló szakmai „teadélutánok” jövőbeni szponzorálását.

Összességében hasznosnak ítéljük meg a „szinergiánkat”, ami nem fejeződött be, s a az eredetileg megcélzott S100 fehérjék komplexeire vonatkozott témán túl, újakat szült (ld. PG és BA együttműködése komplementer rendszer proteázok és inhibitoraik szerkezetvizsgálata, BA és KL új „in cell” NMR projektje).

- 4) Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. (*max. 200 szó*)

A programot alapvetően sikeresnek értékeljük, azzal együtt, hogy a szenior résztvevők bérkiegészítés formájában érkező támogatása csak korlátozottan tudta segíteni az jelentős anyagi ráfordítással járó „közös” kísérletek finanszírozását. Megfontolandónak tartjuk, hogy amennyiben a jövőben is lesz hasonló pályázati kiírás a kutatócsoportok esetén a szinergiában résztvevő PI a diák vagy predoktor munkatársainak a támogatására is fordíthassa az esetlegesen elnyert összeget. Azonkívül sokkal „szimpatikusabb” lenne olyan támogatás, ami részben dologi (vagy kis értékű műszer) vásárlására közvetlenül is fordítható.