

36. OTDK Biológia szekció

RSK (Riboszomális fehérje S6-kináz) aktivitás tanulmányozására alkalmas kísérleti rendszer kidolgozása

készítette:

Dénes Laura

Biotechnológia Msc

témavezető:

Dr. Alexa Anita

tudományos munkatárs

ELKH Természettudományi Kutatóközpont

Dr. Reményi Attila

tudományos tanácsadó

ELKH Természettudományi Kutatóközpont

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Budapest, 2023

Rövidítés jegyzék

ERK – Extracellular signal regulated kinase

MAPK – mitogen activated protein kinase

RSK – Ribosomal S6 kinase

JAK – Janus Kinase

STAT – Signal transducer and transcription activator

EGFR _ Epidermal growth factor receptor

TNFR – Tumor necrosis factor receptor

Sos1 – Son of Sevenless homolog 1

DAPK – death associated protein kinase

eIF4B – Eukaryotic translation initiation factor 4B

BMF – Bcl-2 modifying factor

PDCD4 – Programmed Cell Death Protein-4

RHDF1 – Inactive Rhomboid Protein 1

YopM – Outer Membrane Protein YopM (*Yersinia Pestis*)

POLG – Genome Polyprotein (*Encephalomyocarditis*)

PI3K – Phosphatidyl Inositol-3 kinase

ORF – Open Reading Frame

Bevezetés

A normál működés fenntartása érdekében a sejtek számára fontos, hogy a környezetükről információt gyűjtsenek, azokat továbbítsák, feldolgozzák, és az adott jelre a sejtek adaptív választ adjanak. Egy sejtre számos jel érkezik, akár élelemforrás, szignálmolekulák (pl. növekedési hormonok) vagy fizikai hatás (pl. UV, hő) formájában (Yue és López 2020). A sejt működése szempontjából elengedhetetlen, hogy ezekre a jelekre megfelelő választ nyújtson, amihez az első lépés, hogy a sejten kívülről érkező jel a sejten belüli célponthoz eljusson. Erre szolgálnak a jelátviteli útvonalak.

A jelátvitel egy információ áramlási mód a sejten belül, amelyet főként fehérjék alkotnak, amelyek egymásra hatnak, de elemei lehetnek nem fehérje jellegű ágensek is (pl. Ca^{2+} , inozitol-foszfát). Ilyen jelátviteli útvonalak, vagy kaszkádok, a JAK-STAT útvonal, a PI3K-Akt útvonal, illetve a MAPK-útvonal (Mitogen Activated Protein Kinase). Ez utóbbi kiemelten fontos szerepet tölt be a sejtek működésében, mert különböző jelekre tud aktiválódni és ennek következményeképpen számos hatással van a sejt működésére. A MAPK-útvonalat, hasonlóan a többi kaszkádhoz, több fehérje alkotja, amelyek szekvenciális módon aktiválják egymást foszforiláció formájában (Roskoski 2012). Az útvonalat aktiválhatják hormonok (pl. EGFR, TNFR), de aktivációt kiválthatnak fizikai hatások is. A jelet a membrántól a fehérjék továbbítják a célpontra. A kaszkád hierarchiájában felül helyezkedik el a MAPKK kináz (MAP3K), ez aktiválja a MAPK kinázt (MAP2K), ettől lejjebb pedig a MAP kináz (MAPK) található (Cargnello és Roux 2011). A kaszkád kiegészül a MAPK szubsztrátjaival, illetve a receptortól a MAPKKK-ig jelet továbbító fehérjékkel.

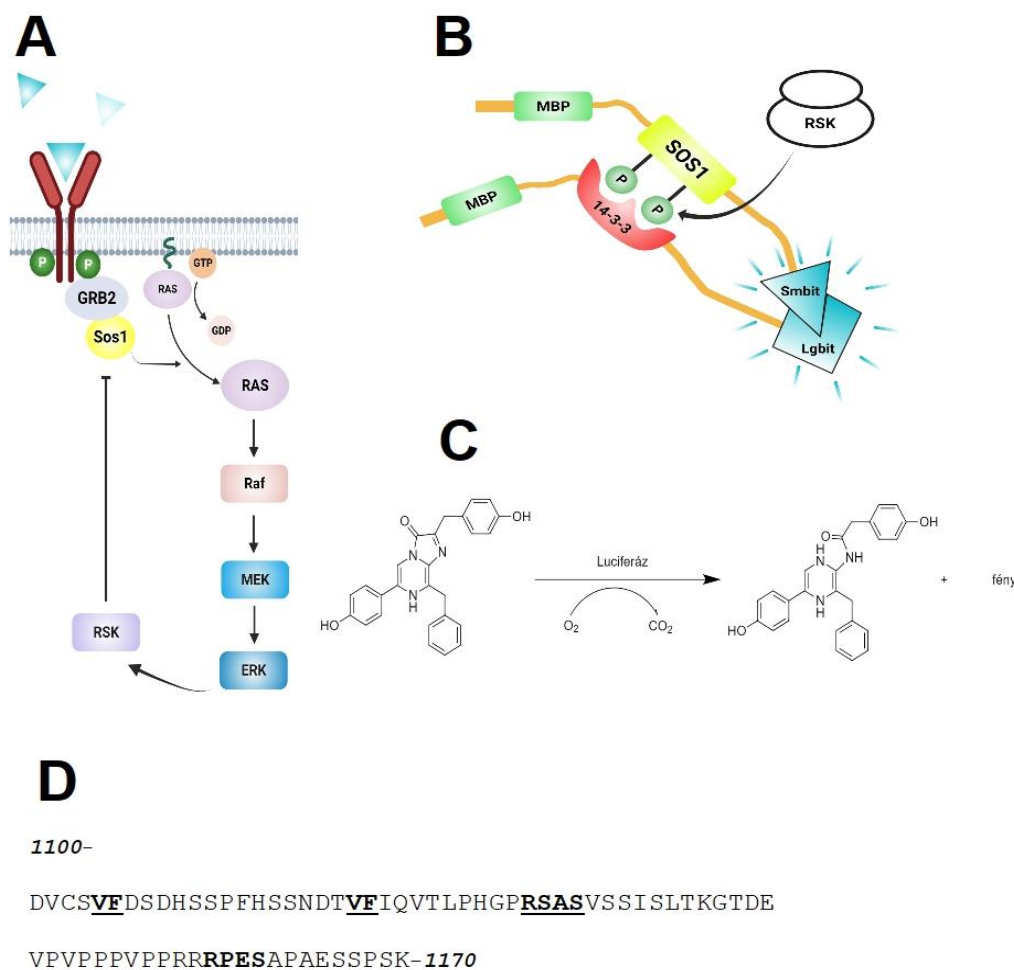
Az egyik gyakran tanulmányozott kaszkád a MAPK-útvonalon belül a Raf-MEK-ERK útvonal. Ezeknek a fehérjéknek a mutációi gyakran rákos transzformációkhoz és proliferációhoz vezetnek. A teljes útvonal az 1. ábrán látható. Az ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) szubsztrátjaként az AGC-kináz RSK2 kiemelt szerepet tölt be a sejtek proliferációjának, túlélésének és növekedésének szabályozásában (Romeo, Zhang, és Roux 2012). Az RSK2 szubsztrátjai közé tartozik a c-Fos, DAPK, eIF4B, illetve Sos1 (Son of Sevenless 1) fehérje (Cargnello és Roux 2011; Saha és mtsai 2012). Ez utóbbi a MAPK-útvonalat aktiváló Ras fehérje aktivátora, egy GEF (Guanine nucleotide exchange factor) fehérje. Amikor az útvonal aktiválódik, a Sos1 hatására a Ras fehérje a kötött GDP-t GTP-re cseréli, ami aktív állapotba viszi a fehérjét, és a Raf-n keresztül beindítja a kaszkádot, amelyben végül az RSK2 is foszforilálódik, majd szubsztrátját, a Sos1-t foszforilálja két szerin aminosavon. Ezek a foszforilációs pontok egybe esnek a 14-3-3 ϵ fehérje kötőhelyével, amely

így szekvesztrálja a Sos1-t, és így annak hatása az útvonalra megszűnik (Saha és mtsai 2012). Ennek révén az RSK2-nek negatív szabályozó szerepe van az őt aktiváló útvonalra (1/A ábra).

Ezeket a jelátviteli útvonalakat gyakran célozzák patogének, hogy a sejt működését befolyásolják. A Kaposi-szarkómát okozó HHV-8 (Human Herpes Virus 8) fertőzéskor a gazdasejtben expresszáldó ORF45 egy virális fehérje, amelynek az N-terminális felé eső 60 aminosavnyi szakasza (16-76) az ERK2-t és RSK2-t képes egyszerre kötni a MAPK-útvonalban (Alexa és mtsai. 2022). Nemrég derült fény arra, hogy egyéb motívumok mellett ebben a rövid szakaszban található egy Val-Phe-motívum (VF), amelyet N-terminálisan negatívan töltött aminosavak határolnak. Ez a motívum megtalálható olyan eukarióta fehérjékben is, amelyek az RSK2 szubsztrátjai (pl. BMF, Sos1, PDCD4, RHDF1), de más, virális eredetű fehérjékben is megtalálható (pl., YopM, POLG) (Ebrahim és mtsai. 2016; Galan és mtsai. 2014; Hentschke és mtsai. 2010). Az OTDK munkám során azt vizsgáltam, hogy az ORF45 virális fehérjének rövid peptid szakaszai vad és mutáns változatban, (ORF15, ORF17), illetve ciklus formában (KGC, KAC és KC peptidek) milyen erősen tudnak kötődni az aktív RSK2 enzimhez, azaz kompetitív kináz reakciókban hogyan gátolja a szubsztrát RSK2 általi foszforilációját, így mekkora inhibítor állandóval (K_I) jellemezhető.

Az alábbi munkámban bemutatom, hogy a MAPK-útvonalat befolyásoló három fehérje (RSK2, Sos1, 14-3-3 ϵ) kölcsönhatásait kihasználva egy olyan RSK2 szenzor készítettem, amellyel az RSK2-preparátumok kináz-aktivitását, illetve a labor munkatársai által tervezett szintetikus peptid inhibitoroknak a hatását tudtam mérni. A peptid inhibitorok alkalmazhatóak olyan kinázok aktivitásának gátlására, amelyeknek szerepe lehet betegségek kialakulásában, így fejlesztésük terápiás szempontból fontos (Patterson és mtsai. 2014; Wójcik és Berlicki 2016). A szenzor alapja a fragmens komplementáció, ebben az esetben a NanoBit módszer, amely egy két fragmensre (LgBit és SmBit) hasított luciferáz asszociációján alapul (Xu és mtsai. 2020). A két fragmens a két partner fehérjéhez van fúzionáltatva, N-vagy C-terminális irányban, és amikor a partnerek kölcsönhatásba lépnek, akkor a luciferáz egy egésszé válik és képes átalakítani a szubsztrát molekuláját, aminek hatására foton keletkezik (Cooley és mtsai. 2020; Dixon és mtsai. 2016). Az így jelentkező lumineszcencia jel mérhető. Az általam készített szenzorban a luciferáz két fragmense a 14-3-3 ϵ fehérjén és Sos1 fehérje szakaszon van. A Sos1 fehérjének nem a teljes hosszát, hanem csak egy 70 aminosavas fragmensét használtam (Sos1.70), amely magába foglalta a 14-3-3 ϵ kötéséhez szükséges két RSK foszforilációs helyet (RxxS-motívum, 1/D ábra). A fehérjék között fellépő kölcsönhatást a Sos1 RSK2 általi foszforilációja okozza. A kölcsönhatás következtében a luciferáz fragmensek komplementációja lép fel. Az összeállt fehérje oxidálja a coelenterazine szubsztrátot, ami

fotonok keletkezéséhez vezet, így a szenzor alkalmas az RSK2 aktivitás monitorozására. Az alábbi beszámoló célkitűzése, az RSK-aktivitás szenzor létrehozása, optimalizálása és szintetikus peptid inhibitorok gátló hatásának tesztelése (K_i meghatározás).



1. ábra: **A.** A MAPK-útvonaltól a membrántól a cél fehérjéig vezet, és egymást követő szekvenciális foszforiláció alapú aktiválódás továbbítja a jelet. A receptortól (pl. EGFR) a jel a Sos1 fehérje révén a Ras aktivációjához vezet, amely további fehérjéken keresztül az RSK2 foszforilációját eredményezi. Az RSK2 szubsztrátja a Sos1, amelynek foszforilációja szekvesztrációt okoz, azaz a fehérjét inaktív állapotba hozza a megkötése által, így a pálya negatív szabályozása érvényesül. **B.** A Sos1 inaktivációját a 14-3-3 ϵ fehérje általi szekvesztráció okozza, amelynek feltétele a foszforilációs esemény. **C.** A luciferáz fehérje átalakítja a coelenterazine szubsztrátot, amelynek eredménye a foton keletkezése, amely mérhető. **D.** A szenzor alapja a 14-3-3 ϵ /Sos1 kölcsönhatás, de a megalkotásában csak a Sos1 70 aminosavas szegmensét használtam, amely hordozza a két RSK2-foszforilációs helyet (RxxS), illetve megtalálható benne két VF-motívum is.

Anyagok és módszerek

In vitro rendszer tervezése és klónozás. A 14-3-3 ϵ -t és a Sos1 fehérje részletet kódoló szekvenciát első lépésben be kellett illeszteni a luciferáz fragmensek mellé. Kiinduló lépésként a fragmensek a két fehérje C-terminálisára kerültek, a LgBit a 14-3-3 ϵ -ra, míg a SmBit a Sos1.70-re került. Elméletben összesen nyolc féle lehetséges módon lehetne a rendszert felépíteni, azonban kollégáim hasonló rendszerek megalkotásakor szerzett korábbi tapasztalatai alapján elsőként ezzel próbáltuk meg. A luciferáz LgBit és SmBit fragmensét két különböző, bakterális expressziós plazmid hordozta. A 14-3-3 ϵ és Sos1.70 szekvenciáit szubklónozással illesztettem be a luciferáz fragmensek N-terminálisára. A folyamat során olyan enzimeket választottam, hogy a kölcsönható fehérjéket kódoló szekvenciák N-terminálisán MBP-címke (Maltose Binding Protein) is legyen a végső konstrukcióban, amely segíti a fúziós fehérje expresszióját, és a tisztítást is lehetővé teszi. A klónozás során BamHI és NotI enzimeket használtam, amelyekkel a célvektorokat emésztettem, illetve az inszerteket kiemésztettem a korábbi vektorokból. A fragmenseket agaróz gélben szeparáltam, izoláltam, majd az inszerteket ligáltam. A ligálási elegyet kompetens Xl1Blu sejtekbe transzformáltam, majd carbenicillin tartalmú agar-lemezen szélesztettem. A felnőtt telepekből a plazmidot izoláltam, a bennük lévő inszert tartalmát szekvenálással ellenőriztem (Microsynth AG).

Fehérje termelése és tisztítása. A fehérjéket BL21 (DE3) sejtekben expresszáltattam, mindkettő esetében overnight, 18 °C-n történt az expresszió, indukálószerként 200 μ M IPTG-t alkalmaztam. A sejtek feltárását lízispufferben, fel-lefagyasztással és szonikálással végeztem, 10 μ g/ml DNáz mellett. A fehérjéket elsőként nikkelaffinitás kromatográfiával, majd MBP-gyanta segítségével tisztítottam. A tisztítások során gyűjtött frakciókból mintát vettem, 10%-s SDS-Poliakrilamid gélen futtattam, illetve a koncentrációját Bradford-reagenssel meghatároztam 595 nm-n mérhető abszorbancia alapján. A tisztított fehérjét kis adagokra osztottam és folyékony nitrogénes fagyasztást követően -80 °C-n tároltam. A mérések során használt RSK2 fehérjét a labor már készen biztosította.

NanoBit mérés. A méréseket a rendszer beállításával kezdtem. Összehasonlítottam a 14-3-3 ϵ és Sos1.70 koncentráció arányokat, illetve a reakcióban használt RSK2 mennyiségét is. A kinetikai mérésekben a pontokra illesztett meredekségek arányát vizsgáltam, ezért a cél egy olyan optimum beállítása volt, ahol biztonsággal megállapítható a kezdeti sebesség. A reakcióelegy állandó összetevői: 1X kináz puffer (pH 7,4, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5% glicerín, 0,05% Igepal), 40 μ M coelenterazine (DMSO-ban oldott), 1 mM DTT, steril víz. A mérést BioTek Synergy 2 gépen végeztem, 25 °C-n. A reakciót ATP (1 mM) hozzáadásával indítottam, ami 1X kináz pufferben volt oldva. A mérések során a negatív

kontroll olyan reakció volt, amely nem tartalmazta az RSK2-t. A szintetikus inhibitor K_i -értékek meghatározásánál a pozitív kontroll az inhibitort nem tartalmazó reakcióelegy volt. A K_i - érték meghatározásokban használt szintetikus peptideket a labor szolgáltatta. A mérési adatokra a K_i -érték meghatározásnál az Origin 2018 programmal illesztettem a DoseResponse függvényt.

Eredmények

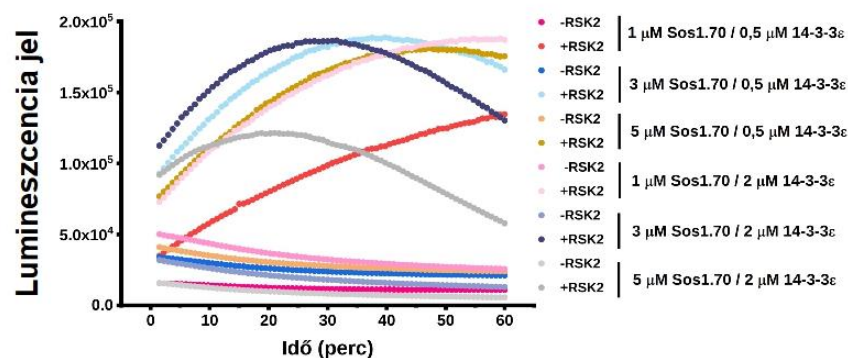
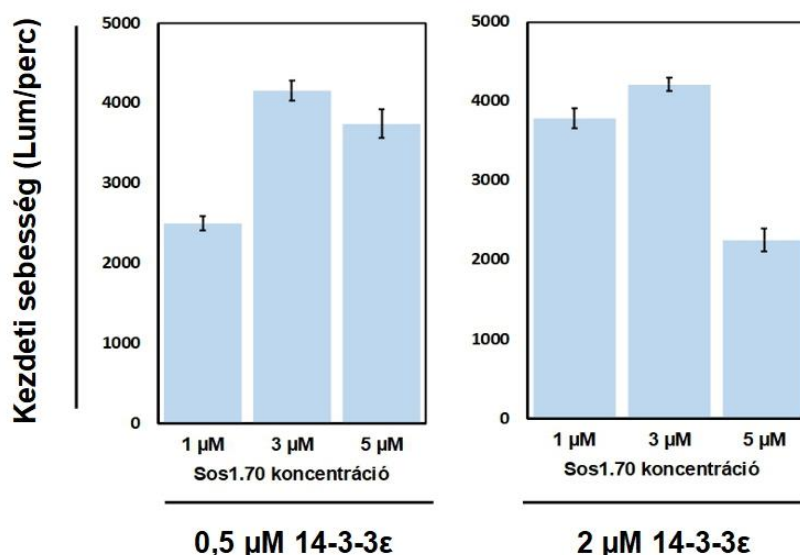
Mielőtt a rendszerrel meghatároztam volna a tesztelni kívánt szintetikus peptidek K_i -értékét, előbb optimalizálni kívántam a mérést. Az optimalizáció célja a Sos1.70 és 14-3-3 ϵ egymáshoz viszonyított arányának, illetve az RSK2 mennyiségének meghatározása volt. Emellett figyelembe vettem a mérés során használt 96-lyukú lemez pozícióinak, továbbá a puffer komponensek és az inert fehérjeként jelenlévő BSA koncentráció hatását is.

Komponensarány beállítása. Elsőként a reakcióban résztvevő komponensek egymáshoz viszonyított arányait mértem. A kísérletben alkalmazott arányok az 1. táblázatban láthatók. A kísérletben az RSK2 koncentrációja 20 nM volt.

1. táblázat: A szenzor komponenseinek egymáshoz viszonyított arányát beállító kísérletben alkalmazott Sos1.70 és 14-3-3 ϵ koncentrációk

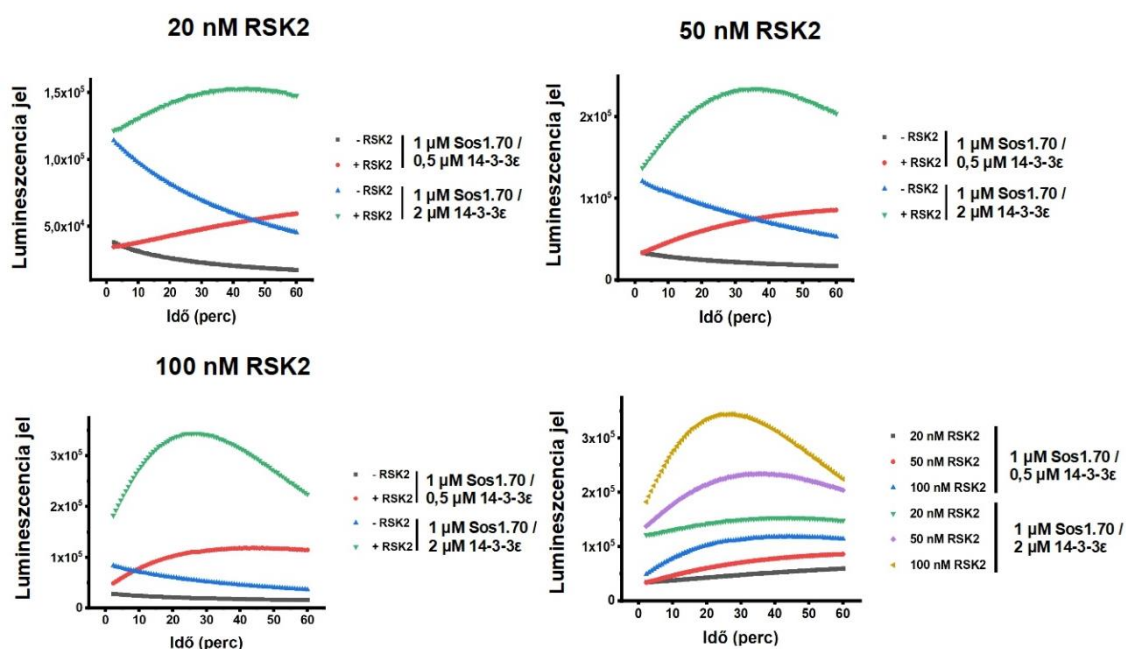
Sos1.70	14-3-3 ϵ
1 μ M	0,5 μ M
3 μ M	0,5 μ M
5 μ M	0,5 μ M
1 μ M	2 μ M
3 μ M	2 μ M
5 μ M	2 μ M

Az eredmények alapján az 1 μ M Sos1.70 és 0,5 μ M 14-3-3 ϵ mennyiségek voltak azok, amelyeknél a pontokra illesztett egyenes meredeksége a legnagyobb biztonsággal meghatározható. Látható, hogy az 1 μ M Sos1.70 és 2 μ M 14-3-3 ϵ mellett viszonylag sokáig egyenes a lumineszcencia-idő görbe kezdeti szakasza, de a kevesebb fehérje igény miatt az 1 μ M Sos1.70 és 0,5 μ M 14-3-3 ϵ arányokat választottam (2/A, 2/B ábra).

A**B**

2. ábra: **A.** A komponens arányok beállítása során mért lumineszcencia jel az idő függvényében. A diagram alapján látható, hogy az 1 μM Sos1.70 / 0,5 μM 14-3-3ε arány a megfelelő arra, hogy a kezdeti sebességet biztonságosan meg lehessen állapítani. **B.** Az egyes arányok során mért kezdeti sebesség (3 párhuzamos mérés átlaga és standard deviációja).

RSK2 koncentráció beállítása. Ezt követően teszteltem a reakciót változó RSK2 koncentráció (20 nM, 50 nM és 100 nM) mellett a megfelelő enzim mennyiség beállítás céljából. A korábbi mérés alapján alacsony meredekséggel rendelkező 1 μM Sos1.70 és 0,5 μM 14-3-3ε arány mellett még teszteltem a 1 μM Sos1.70 és 2 μM 14-3-3ε párosítást is. A tesztelésnél 20 nM, 50 nM és 100 nM RSK2 koncentráció mellett mértem a lumineszcenciát.

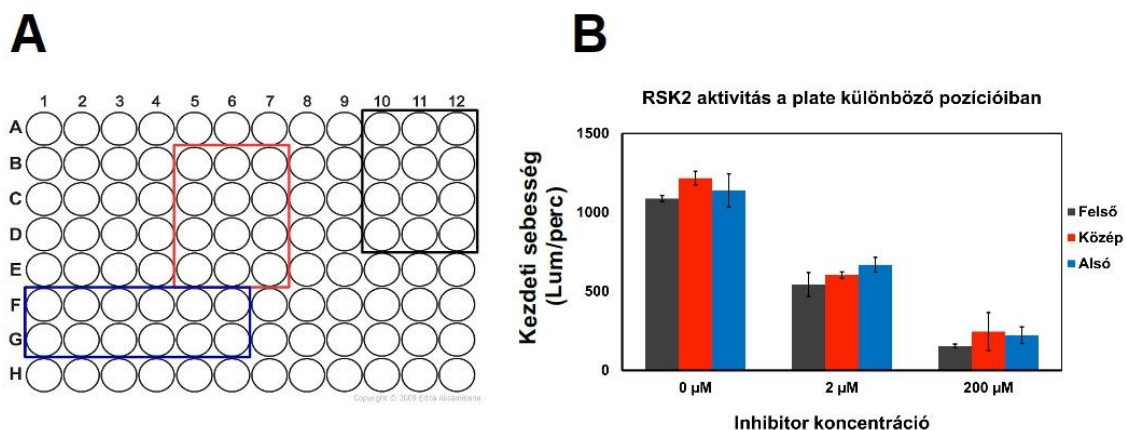


3. ábra: Eltérő RSK2 mennyiség mellett mért aktivitás két különböző komponensarány mellett. Az utolsó panel a három korábbi panel méréseinek +RSK2 görbéit együtt ábrázolja.

A kapott eredmények szerint azok az esetek, ahol 2 μM a 14-3-3 ϵ koncentráció, ott a rendszer gyorsan telítődik, így az előző méréshez hasonlóan, ebből is az a következtetés vonható le, hogy az 1 μM Sos1.70 / 0,5 μM 14-3-3 ϵ párosítás a megfelelő. Az RSK2 tekintetében látható, hogy a koncentráció emelésével nő a meredekség is. Ezek alapján a legalacsonyabb meredekségű 20 nM-s beállítás lenne az ideális olyan mérésekhez, ahol a meredekség alapján szeretnénk a kezdeti sebességet számolni. Mivel ezzel a szenzor rendszerrel előfordulhat azonban, hogy nagy számú mintát kell egyszerre lemérni (pl. inhibitor könyvtárak esetén), fontos szempont lehet egy olyan arány és enzim mennyiség kiválasztása, amelyik lehetővé teszi a végponton alapuló mérést is (ebben az esetben nem a kezdeti sebesség, hanem a telített mérések maximális jeleit hasonlítjuk össze). Ilyen jellegű mérések inhibitor könyvtárak tesztelésében lehetnek alkalmasak nagyszámú minta gyors mérésére. Ekkor érdemesebb a 100 nM RSK2 koncentrációt kiválasztani 1 μM Sos1.70 / 0,5 μM 14-3-3 ϵ koncentrációk mellett.

Lemezpozíció tesztelése. A rendszer beállítása után leteszteltem, hogy a 96-lyukú lemez különböző pontjaira felvitt méréseknek van-e hatása a jelre, ezzel kizárva a későbbiekben esetleg jelentkező hatásokat. A mérés során a lemezen három különböző blokkban végeztem el

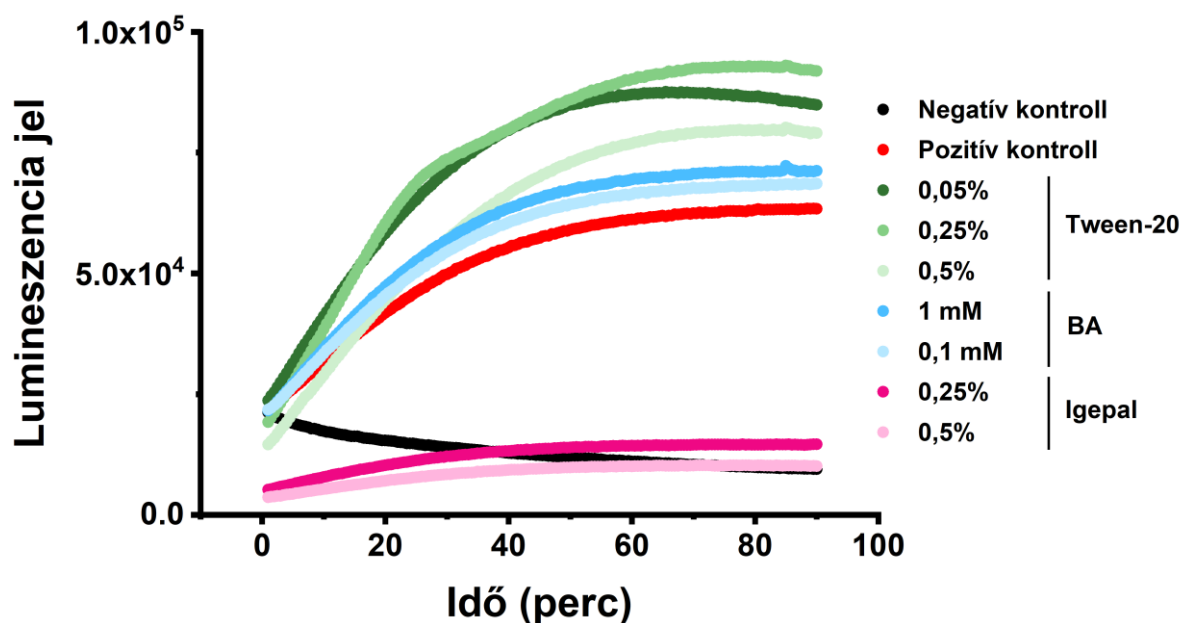
méréseket, ezeket *felső*, *középső* és *alsó* blokknak neveztem el (4/A.ábra). A mérésekben a negatív és pozitív kontroll mellett ORF10F10 inhibítort is alkalmaztam. A kísérlet célja annak megállapítása, hogy az inhibítorok hatása a lemez különböző pontjain ugyanolyan mértékű-e. A mérésben alkalmazott inhibítor az ORF45-ből származó, már ismert hatású peptid, az ORF10F10 volt. Ez egy olyan szakasza a fehérjének, amelyik tartalmazza a VF-motívumot és bizonyítottan gátló hatása van az RSK2-re.



4. ábra: A lemez pozíciója alapján végzett mérés. **A.** a mérésben felső (fekete), középső (piros) és alsó (kék) blokkokban végeztem a méréseket. **B.** A mérés eredményei növekvő inhibitor koncentráció mellett (három párhuzamos mérés átlaga és standard deviációja)

Az eredményekből látható, hogy a lemez különböző pozícióiban mért RSK2 aktivitások nem mutatnak számottevő eltérést (4/B ábra). Ez alapján a méréseknél nem kell figyelembe venni, hogy a lemez melyik pontjában zajlik a reakció.

Adalékanyagok hatásának tesztelése. Ezt követően megvizsgáltam a detergensok és pufferkomponensek hatását a kezdeti reakció sebességre, illetve a negatív kontrollra. Ezeknek a méréseknek a során arra voltam kíváncsi, hogy az adalékanyagok jelenléte mekkora eltérést okoz a pozitív kontrollhoz képest. Elsőként azt vizsgáltam, hogy különböző detergensok (Igepal, Tween-20), illetve a fehérjék tisztításakor használt pufferkomponensnek, pl. a benzamidinnek (BA) van-e hatása a rendszerre. Erre azért volt szükség, mert a szenzorral végzett mérésekben használt peptidek esetében előfordulhat, hogy a tisztításuk során használt pufferek ilyen adalék anyagokat tartalmaznak.

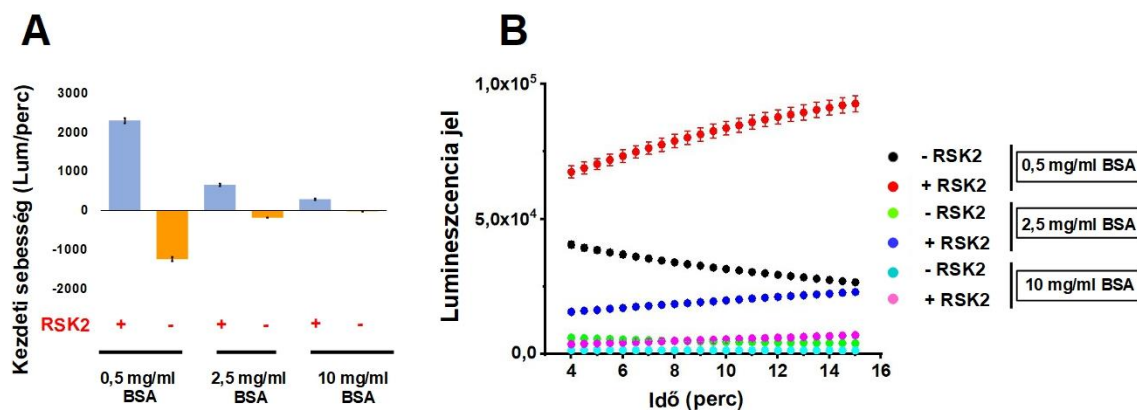


5. ábra: Különböző adalék anyagok mellett mért lumineszcencia jelek az idő függvényében. A mérést 20 nM RSK2, 1 μ M Sos1.70 és 0,5 μ M 14-3-3 ϵ mellett végeztem.

A mért eredmények alapján látható, hogy az adalékanyagoknak az Igepalt leszámítva nincsen olyan hatása, amely a mérést szélsőségesen befolyásolná. A Tween-20 esetében tapasztalható gyorsabb kezdeti sebesség, ez az adalékanyag esetlegesen befolyásolhatja az enzimreakciót, feltehetően serkenti.

A mérések során eddig 0,5 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumine) volt a reakcióelegyben, mint inert fehérje, amely csökkenti az alacsony koncentrációban jelen lévő fehérje komponensek, a szubsztrát kitapadását az Eppendorf cső és a mérések során használt lemez falára. Miután beállítottam a komponensek megfelelő arányát, az RSK2 mennyiségét, tesztelni kívántam, hogy a BSA mennyiségének változtatásával hogyan változik a kezdeti sebesség, illetve a koncentráció emelésével elérhető-e, hogy a negatív kontroll meredeksége ne negatív legyen. A NanoBit mérésekben az irodalmi adatok szerint egy előforduló tendencia, hogy a negatív kontroll kezdeti sebessége csökkenő tendenciát mutat (Shetty, Walzem, és Davies 2020). Ezért megvizsgáltam, hogy a lumineszcencia jel időben hogyan változik a BSA koncentrációjának emelésével.

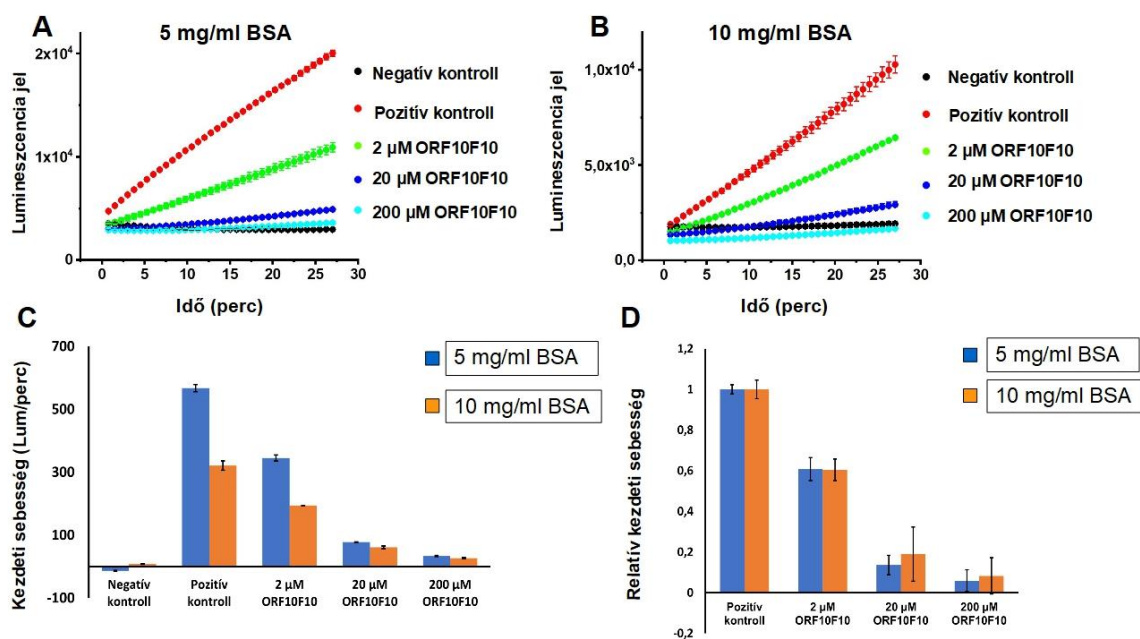
Az első kísérletben három reakciót állítottam össze eltérő BSA koncentrációkkal: 0,5 mg/ml, 2,5 mg/ml és 10 mg/ml BSA. Ebben a mérésben a negatív és pozitív (RSK2-t tartalmazó) mérések lumineszcencia jel változását vizsgáltam, illetve a kezdeti sebesség meghatározással az RSK2 aktivitását.



6. ábra: **A.** Különböző BSA koncentrációk mellett mért RSK2 aktivitásértékek az RSK2-t (pozitív) és RSK2-t nem tartalmazó (negatív kontroll) mérések esetében. **B.** A lumineszcencia jel az idő függvényében különböző BSA koncentráció mellett. A mérést 20 nM RSK2, 1 μ M Sos1.70 és 0,5 μ M 14-3-3 ϵ mellett végeztem (3 párhuzamos mérés átlaga és standard deviációja)

A mérés eredménye alapján a pontokra illeszthető egyenes meredeksége csökkenő tendenciát mutat a BSA koncentráció növelésével. A megemelt BSA koncentráció csökkentheti a fehérje komponensek aspecifikus kitapadását a lemez falára, aminek következtében a fehérjék kivonódnak az oldatból. Ahogy emelkedik a BSA koncentráció, úgy csökken ennek a kivonódásnak a hatása, és a negatív kontroll meredeksége pozitív irány felé tolódik el.

A következő lépésben 5 mg/ml és 10 mg/ml BSA koncentrációk mellett mértem, ezúttal a már korábban is használt ORF10F10 inhibitor kontrollként való alkalmazásával. A peptidből emelkedő koncentráció sorban készítettem el a reakcióelegyeket: 2 μ M, 20 μ M és 200 μ M ORF10F10 oldatok segítségével.



7. ábra: A korábbi méréshez képest megemelt BSA koncentráció mellett végzett mérések eredményei. **A, B.** 5 mg/ml és 10 mg/ml BSA mellett mért lumineszcencia jelek az idő függvényében. **C.** RSK2 aktivitás a két BSA koncentráció mellett végzett mérésekben. **D.** Relatív RSK2 aktivitás a két BSA koncentráció mellett végzett mérésekben (az ábrákon három párhuzamos mérés átlagai és standard deviációi szerepelnek)

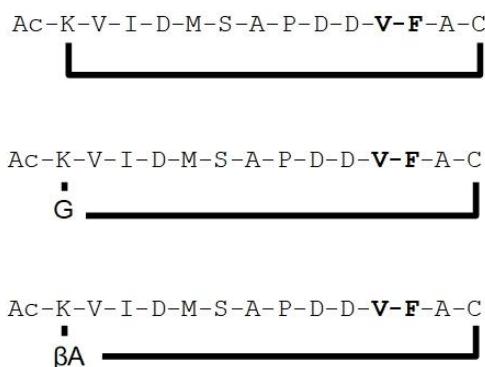
A 7/B és 7/C ábra alapján látható, hogy a 10 mg/ml BSA tartalmú reakcióban alacsonyabb a meredekség a kisebb lumineszcencia jelek miatt, de a relatív RSK2 aktivitások a két koncentráció esetében hasonlóak (7/D ábra). A kisebb jel oka, hogy a BSA „árnyékoló” hatással van a fehérjékre, a köztük fellépő interakciók számát csökkenteni tudja a hozzájuk való kötődéssel. Ez ugyanakkor a mérésekre nem jelent problémát, amennyiben azok során a kontroll reakciók is ugyanolyan koncentrációban tartalmazzák a BSA-t, így a jelerősségekben mért változás minden reakcióban ugyanolyan mértékű. A 7/D ábrán látható, hogy az inhibitorok hatása a két mérésben nagyjából megegyeznek, ezért a BSA tartalom növelésének nincs befolyásoló tényezője a relatív kezdeti sebességre, ellenben a negatív kontroll meredeksége pozitív a 10 mg/ml beállításban (7/C). Ezt a megfigyelést témavezetőm által végzett mérés is alátámasztotta, amiben 0,5 és 6 mg/ml BSA koncentrációk esetében határozta meg ORF10F10 peptid inhibíciós állandóját, amelyek ugyanazt az értéket adták.

Ez alapján arra jutottam, hogy az 5 és 10 mg/ml koncentráció között elhelyezkedő értékek valamelyikével érdemes tovább dolgozni, így a továbbiakban 6 mg/ml BSA koncentrációt alkalmaztam a mérésekben.

K_I meghatározás. A rendszer beállítását követően teszteltem, hogy alkalmas-e a szenzor peptid inhibitorok K_I-értékének meghatározására. Ezért méréseket végeztem el különböző,

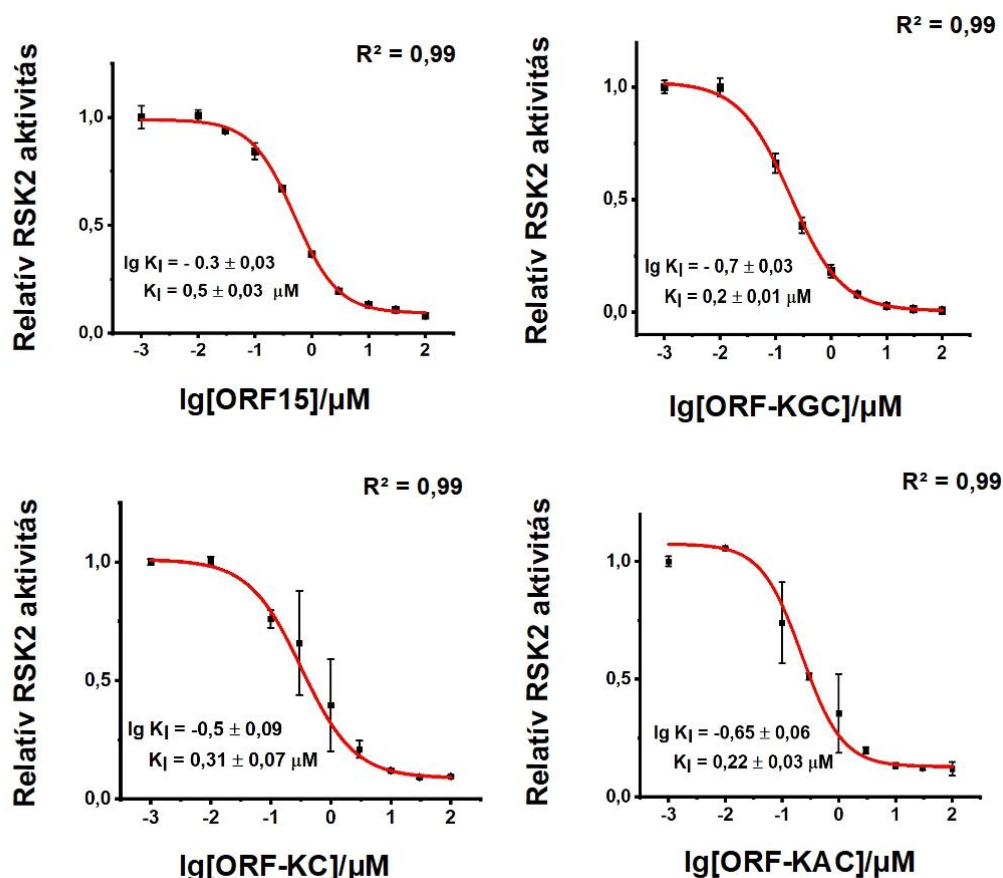
szintetikus peptid inhibitorok esetében. Az első mérésben olyan ORF45 alapján tervezett peptideket mértem le, amelyek ciklikusak, a másodikban pedig ORF45 eredetű mutáns peptidekkel dolgoztam. A mérésekben az volt a célom, hogy a szenzor tesztelése mellett, a virális eredetű ORF45 fehérje és RSK2 fehérje kapcsolatára találjak egy olyan peptid inhibitor, amely kompetitív módon képes lenne gátolni a VF-motívum alapján létrejövő kapcsolatot. Ennek érdekében olyan valin, illetve fenilalanin mutáns peptidek K_i -értékét határoztam meg, amelyek esetében várható, hogy a vad típusnál erősebb hatást fejtenek ki. Emellett azt is teszteltem, hogy a BMF fehérjéből (Bcl-2 modifying factor) származó peptidek esetében van-e gátló hatás. A BMF egy celluláris, anti-apoptotikus fehérje, amely a BAX és BAK fehérjék oligomerizációját gátolja meg, megőrizve ezzel a mitokondrium integritását (Ebrahim és mtsai. 2016). A sejttúlélést segítő hatásai miatt a BMF fehérjét tumor terápiákban lehet célozni, elősegítve a rákos sejtek pusztulását. A BMF fehérje szintén hordozza a VF-motívumot, ezért alkalmas lehet RSK2 inhibitorok fejlesztésére.

ORF-eredetű ciklikus peptidek mérése. A ciklikus peptidekben a peptid eleje és vége közt volt kialakítva az átkötés, amely a három peptid esetében eltérő aminosav volt. Ez alapján a peptidek KAC, KGC és KC nevet kaptak (8. ábra).



8. ábra: A szintetikusan tervezett ciklikus peptidek ciklizációja. **A.** KC peptid. **B.** KGC peptid. **C.** KAC peptid.

Pozitív kontrollként ORF15-t alkalmaztam, amely a fehérje 15 aminosav hosszú szakasza, és ehhez hasonlítottam a peptidek K_i -értékét. A mérés körülményei az optimalizálás során megállapítottak szerinti beállítások voltak. Az eredmények azt mutatták, hogy a ciklikus peptidek K_i -értékei hasonlóak a kontrollként alkalmazott ORF15 értékhez (9. ábra).



9. ábra: A szintetikus ciklikus peptidek (KGC, KAC, KC) K_I -érték meghatározásának eredményei. A mérésben ORF15 peptidet alkalmaztam, ami a ciklikus peptidek lineáris változata (három párhuzamos mérés átlaga és standard deviációja).

ORF-mutáns peptidek K_I -érték meghatározása. A második mérés sorozatban lineáris szintetikus peptid inhibitorokkal dolgoztam. Ezeknek a szekvenciái szintén a ORF45 eredetű peptid VF-motívumára alapulnak, annak azonban különböző mutánsai (10/A ábra). A mérésben a kapott K_I -értékeket a vad típusú ORF17-hez hasonlítottam. Az eredmények azt mutatták azonban, hogy ezeknek az inhibitoroknak jelentősen kisebb a gátló hatásuk van az ORF17 peptiddel szemben (10/B ábra). Ez arra utal, hogy az ORF45-ből származó peptid szakasz mutáns változatai kevésbé alkalmasak inhibitoroknak. A mutánsok közül az LF rendelkezett a legnagyobb gátló hatással. Ez a motívum megtalálható több fehérjében is, felvetve annak lehetőségét, hogy ezek RSK2 szubsztrátok lehetnek, azonban bennük a VF-motívum leucin jellegű változata van jelen. Ilyen motívumot hordozó RSK szubsztrátra az irodalomban már van példa (Galan és mtsai. 2014).

Az ORF-eredetű peptidek mellett BMF eredetű peptidek hatását is mértem ezzel a rendszerrel. A mérésben két változatát használtam ennek a fehérjének: egy rövidebb 15

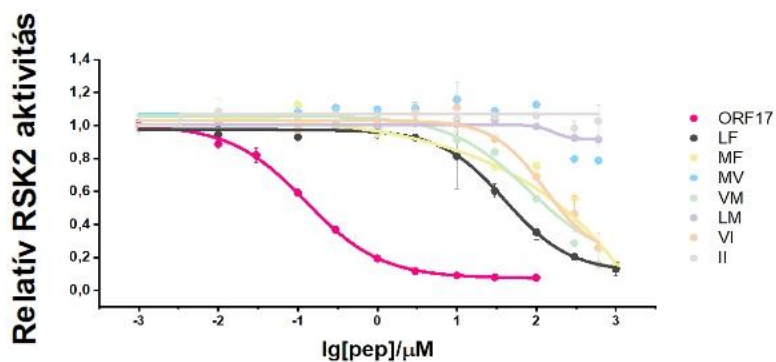
aminosavas (pepBMFshort) és egy 19 aminosav hosszú peptid (pepBMFlong). A mérésekből levonható következtetések szerint a BMF alapú peptidok ugyanolyan mértékben kötődnek a fehérjéhez, mint az ORF45 alapú ORF17 (10/C ábra).

A

ORF17 peptidek

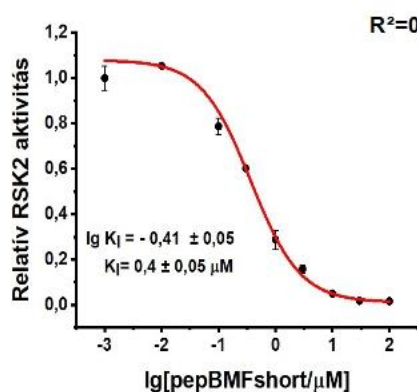
ORF17	PTVIDMSAPDD VF AEDT
LF	PTVIDMSAPDD LF AEDT
MF	PTVIDMSAPDD MF AEDT
MV	PTVIDMSAPDD MV AEDT
VM	PTVIDMSAPDD VM AEDT
LM	PTVIDMSAPDD LM AEDT
VI	PTVIDMSAPDD VI AEDT
II	PTVIDMSAPDD II AEDT

B

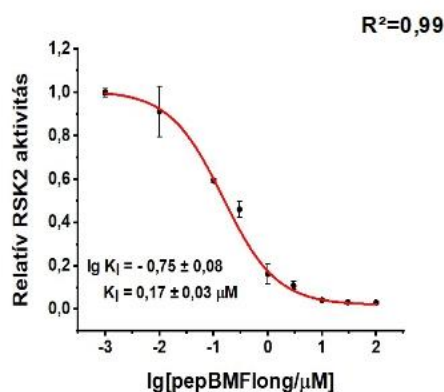


ORF17	$0,13 \pm 0,1 \mu\text{M}$
LF	$41,7 \pm 3,8 \mu\text{M}$
VM	$125 \pm 35 \mu\text{M}$
VI	$229 \pm 146 \mu\text{M}$

C



pepBMFshort: QSVEELEDD**VF**QPED



pepBMFlong: MEPSQSVEELEDD**VF**QPED

10. ábra: Szintetikus peptid inhibitorok mérési eredményei. **A.** Az ORF45-ből származó vad típusú peptidhez hasonlítottam a többi, mutáns peptid gátló erejét. **B.** Relatív RSK2 aktivitás a peptid koncentráció logaritmusának függvényében a különböző mutánsok esetében. Az ORF17 vad típusú peptid fejtette ki a legerősebb hatást, ezt követte az LF mutáns. Azokra a mérésekre, amelyekre lehetett függvényt illeszteni a táblázatban szereplő K_1 -értékekkel rendelkeznek. **C.** BMF fehérjéből származó rövidebb (pepBMFshort) és hosszabb (pepBMFlong)

peptid szakaszok K_i -értékei. Ezeknek a peptideknek a mérése az ORF mutánsokkal együtt zajlott ezért a kontrollként itt a ORF17-t használtam (három párhuzamos mérés átlaga és standard deviációja).

A mérések alapján a szenzor alkalmas volt inhibitorok tesztelésére, mert a növekvő inhibitor koncentrációval az RSK2 aktivitása is csökkent. A mérési pontokra egyenest lehetett illeszteni a mérés teljes időtartama alatt (30 perc), így nagy biztonsággal meghatározható volt a kezdeti sebesség. A mérésekben minden pontban három párhuzamos minta lumineszcencia jelét mértem le, ezeknek a szórása alacsony volt.

Összegzés

Munkámban egy olyan szenzor tervezését, előállítását, optimalizálását és tesztelését írtam le, amely alkalmas az RSK2 kináz aktivitásának mérésére. A szenzor alapja a NanoBit rendszer, amely egy hasított luciferáz fragmenseinek asszociációján alapul. A fragmensek kölcsönható partnerekkel vannak fuzionáltatva, amelyek ebben az esetben a Sos1 fehérje 70 aminosavas szakasza, illetve a 14-3-3 ϵ fehérje. A kölcsönhatás alapja az, hogy az RSK2 két ponton is foszforilálja a Sos1.70 fragmenst (S1134, S1161), s az így kapott foszforilált peptid szakasz kötődik a 14-3-3 ϵ fehérjéhez, ami előidézi a fragmensek összeállását. A rendszer megtervezését és előállítását követően a szenzort optimalizáltam és teszteltem. Az optimalizáció során céлом volt olyan körülmények beállítása is, amelyek mellett a szenzor alkalmas az RSK2 aktivitás meghatározására, ugyanakkor nagyszámú minta esetén végpont alapú kiértékelésre is felhasználható. Ezt a körülményt 1 μ M Sos1.70 és 0,5 μ M 14-3-3 ϵ komponensek és 100 nM RSK2 koncentrációban határoztam meg.

Emellett figyelembe vettem, hogy a szenzorral mérni kívánt peptidek tisztítása során alkalmazott puffer komponenseknek, illetve a mérések során alkalmazott 96-lyukú lemez eltérő pozícióinak van-e hatása az RSK2 aktivitására. A mérésekből azt kaptam, hogy nincs számottevő eltérés a pozitív kontroll és az adalékanyagok jelenléte mellett mért aktivitás között, kivéve az Igepal detergens esetében. Továbbá a lemez pozícióknak (alsó, középső és felső blokk) sem volt hatással a mérésekre. Az optimalizálás utolsó szempontja az volt, hogy olyan BSA koncentrációt találjak, amely a negatív kontroll mérések esetében nem negatív tendenciájú lumineszcencia jelet ad. A negatív jelnek oka lehet a komponensek kitapadása a lemez lyukak falára, amely kivonja a résztvevő partnereket a reakcióból, ezzel fokozatosan gyengítve az abból származó jelet. Megfelelően magas (6 mg/ml) BSA koncentráció mellett ez a tendencia megszűnt.

Az optimalizációt követően a szenzorral teszteltem szintetikus peptid inhibitorok hatását az RSK2-re. A mérésekben ciklikus és mutáns ORF eredetű peptideket, illetve a BMF

fehérjéből származó peptidnek egy rövidebb, illetve egy hosszabb változatát használtam. Az eredmények alapján a szenzor alkalmas volt az inhibitorok mérésére, azonban a mért mutánsok, illetve ciklikus peptidek között nem találtam olyat, amely az ORF45 eredetű peptid szakaszoknál kisebb K_i -értékkel rendelkezne. Amellett, hogy a peptidek gátló hatásait vizsgáltam, ezek a mérések azt is megmutatták, hogy a VF-motívumban a valinnak és a fenilalanninak is fontos szerepe van. Ugyanakkor a Valin-Leucin cserének volt a legalacsonyabb K_i -értéke a többi mutánsához képest, ez a motívum pedig meg is jelenik RSK szubsztrátokban, pl. PDCD4-ben, amely kölcsönhat az RSK2-vel (Galan és mtsai. 2014). Ez további vizsgálatokra adhat okot a motívum és RSK-kölcsönhatások jellemzésében.

A szenzor a jövőben validálható sejtes rendszerben is, illetve *in vitro* körülmények között inhibitor könyvtárak tesztelésére is alkalmazható. Ezzel kapcsolatos mérések már folyamatban vannak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a munkám során az útmutatást és támogatást Dr. Alexa Anitának és a témavezetést Dr. Reményi Attilának.

Irodalom

- [1] Alexa, A., Sok, P., Gross, F., Albert, K., Kobori, E., Póti, Á. L., Gógl, G., Bento, I., Kuang, E., Taylor, S. S., Zhu, F., Ciliberto, A., & Reményi, A. (2022). A non-catalytic herpesviral protein reconfigures ERK-RSK signaling by targeting kinase docking systems in the host. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28109-x>
- [2] Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mmb.00031-10>
- [3] Cooley, R., Kara, N., Hui, N. S., Tart, J., Roustan, C., George, R., Hancock, D. C., Binkowski, B. F., Wood, K. v., Ismail, M., & Downward, J. (2020). Development of a cell-free split-luciferase biochemical assay as a tool for screening for inhibitors of challenging protein-protein interaction targets. *Wellcome Open Research*, 5, 20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15675.1>
- [4] Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., MacHleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G., Eggers, C. T., Encell, L. P., & Wood, K. v. (2016). NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chemical Biology*, 11(2), 400–408. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00753>
- [5] Ebrahim, A. S., Sabbagh, H., Liddane, A., Raufi, A., Kandouz, M., & Al-Katib, A. (2016). Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein. In *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Vol. 142, Issue 9, pp. 2013–2022). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2144-1>

- [6] Galan, J. A., Geraghty, K. M., Lavoie, G., Kanshin, E., Tcherkezian, J., Calabrese, V., Jeschke, G. R., Turk, B. E., Ballif, B. A., Blenis, J., Thibault, P., & Roux, P. P. (2014). Phosphoproteomic analysis identifies the tumor suppressor PDCD4 as a RSK substrate negatively regulated by 14-3-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1405601111>
- [7] Hentschke, M., Berneking, L., Campos, C. B., Buck, F., Ruckdeschel, K., & Aepfelbacher, M. (2010). Yersinia virulence factor YopM induces sustained RSK activation by interfering with dephosphorylation. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013165>
- [8] Hwang, B., Engel, L., Goueli, S. A., & Zegzouti, H. (2020). A homogeneous bioluminescent immunoassay to probe cellular signaling pathway regulation. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0723-9>
- [9] Kuang, E., Tang, Q., Maul, G. G., & Zhu, F. (2008). Activation of p90 Ribosomal S6 Kinase by ORF45 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Its Role in Viral Lytic Replication. *Journal of Virology*, 82(4), 1838–1850. <https://doi.org/10.1128/jvi.02119-07>
- [10] Kuang, E., Tang, Q., Maul, G. G., & Zhu, F. (2008). Activation of p90 Ribosomal S6 Kinase by ORF45 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus and Its Role in Viral Lytic Replication. *Journal of Virology*, 82(4), 1838–1850. <https://doi.org/10.1128/jvi.02119-07>
- [11] Li, X., Huang, L., Xiao, Y., Yao, X., Long, X., Zhu, F., & Kuang, E. (2019). Development of an ORF45-Derived Peptide To Inhibit the Sustained RSK Activation and Lytic Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. <https://doi.org/10.1128/JVI>
- [12] Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., & Siebert, S. (2014). Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 176, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.1111/cei.12248>
- [13] Romeo, Y., Zhang, X., & Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases. In *Biochemical Journal* (Vol. 441, Issue 2, pp. 553–569). <https://doi.org/10.1042/BJ20110289>
- [14] Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. In *Pharmacological Research* (Vol. 66, Issue 2, pp. 105–143). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- [15] Saha, M., Carriere, A., Cheerathodi, M., Zhang, X., Lavoie, G., Rush, J., Roux, P. P., & Ballif, B. A. (2012). RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *Biochemical Journal*, 447(1), 159–166. <https://doi.org/10.1042/BJ20120938>
- [16] Shetty, S. K., Walzem, R. L., & Davies, B. S. J. (2020). A novel NanoBiT-based assay monitors the interaction between lipoprotein lipase and GPIHBP1 in real time. *Journal of Lipid Research*, 61(4), 546–559. <https://doi.org/10.1194/jlr.D119000388>
- [17] Wójcik, P., & Berlicki, Ł. (2016). Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* (Vol. 26, Issue 3, pp. 707–713). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.084>
- [18] Woldman, Y. Y., Eubank, T. D., Mock, A. J., Stevens, N. C., Varadharaj, S., Turco, J., Gavrillin, M. A., Branchini, B. R., & Khramtsov, V. v. (2015). Detection of nitric oxide production in cell cultures by luciferin-luciferase chemiluminescence.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 465(2), 232–238.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.001>

- [19] Xu, X., Lemmens, L. J. M., den Hamer, A., Merkx, M., Ottmann, C., & Brunsveld, L. (2020). Modular bioengineered kinase sensors via scaffold protein-mediated split-luciferase complementation. *Chemical Science*, 11(21), 5532–5536.
<https://doi.org/10.1039/d0sc00074d>
- [20] Yue, J., & López, J. M. (2020). Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>