

A jelátviteli folyamatok alapvetően a biológiai membránokban, illetve a felületük mentén szerveződő fehérje-komplexek összetétele és dinamikája által meghatározottak. Mindkét folyamatban aktív szerepet töltenek be a membránok lipid-komponensei, egyrészt magát a specifikus felületet, másrészt a jelátviteli folyamatokban keletkező lipid mediátorokat is szolgáltatva. Az OTKA által támogatott munkánk során megmutattuk, hogy a szfingozilfoszforilkolin (SPC, egy endogén jelátviteli lipid) a kalmodulinhoz (CaM) szelektíven kötődve gátolja a fehérje funkcióját. Ezzel azonosítottuk az SPC első intracelluláris célfehérjét, valamint a CaM első endogén gátlószerét. A CaM-SPC kölcsönhatás teljes biokémiai jellemzését két magas impakt faktorú szacikkben közöljük le, mindkettő elfogadásra került. A Journal of Biological Chemistry cikkünkben bizonyítjuk a gátlás kompetitív jellegét és biokémiailag részletesen jellemezzük az SPC-CaM-melittin rendszert, míg a FASEB Journal cikkünkben megadjuk a CaM-SPC kölcsönhatás teljes kinetikai leírását és a komplex kristályszerkezetét. Megmutatjuk, hogy a fehérje nem egy lipid molekulával, hanem a lipidek asszociátumával hat kölcsön, ami a membrán-határolt jelátviteli folyamatok szempontjából releváns új megfigyelés.

Signal transduction is determined by the composition and dynamics of protein-complexes organized within and at the plasma membrane. The membrane itself actively plays double roles in this process serving the specific surface as well as giving rise to lipid mediators born in signaling. We have shown in a work supported by OTKA that the endogenous signaling lipid sphingosylphosphorylcholine (SPC) binds selectively to calmodulin (CaM) and inhibits its function. Thereby we have identified the first intracellular target protein for SPC as well as the first endogenous inhibitor for CaM. We have described the complete biochemical characterization of the CaM-SPC interaction in two high-impact journals, both manuscripts having been already accepted. In a Journal of Biological Chemistry paper we proved the competitive nature of the inhibition and gave a detailed characterization of the SPC-CaM-melittin system. In a FASEB Journal paper we provided the complete kinetic description of the CaM-SPC interaction and the crystal structure of their complex. We pointed out that the protein interacts with the associated form of the lipid and not with a single molecule, which is a relevant new observation regarding the membrane-limited signaling processes.

- Az alábbi két cikk került publikációra:

1) Kovacs E(1), Tóth J(1), Vértessy BG(1), Liliom K(1) J Biol Chem v.285, pp.1799-808. Dissociation of calmodulin-target peptide complexes by the lipid mediator sphingosylphosphorylcholine: implications in calcium signaling. PMID: 19910470

(1)Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

abstract:

Previously we have identified the lipid mediator sphingosylphosphorylcholine (SPC) as the first potentially endogenous inhibitor of the ubiquitous Ca²⁺ sensor calmodulin (CaM) (Kovacs, E., and Liliom, K. (2008) Biochem. J. 410, 427-437). Here we give mechanistic insight into CaM inhibition by SPC, based on fluorescence stopped-flow studies with the model CaM-binding domain melittin. We demonstrate that both the peptide and SPC micelles bind to CaM in a rapid and reversible manner with comparable affinities. Furthermore, we present kinetic evidence that both species compete for the same target site on CaM, and thus SPC can be considered as a competitive inhibitor of CaM-target peptide interactions. We also show that SPC disrupts the complex of CaM and the CaM-binding domain of ryanodine receptor type 1, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1, and the plasma membrane Ca²⁺ pump. By interfering with these interactions, thus inhibiting the negative feedback that CaM has on Ca²⁺ signaling, we hypothesize that SPC could lead to Ca²⁺ mobilization in vivo. Hence, we suggest that the action of the sphingolipid on CaM might explain the previously recognized phenomenon that SPC liberates Ca²⁺ from intracellular stores. Moreover, we demonstrate that unlike traditional synthetic CaM inhibitors, SPC disrupts the complex between not only the Ca²⁺-saturated but also the apo form of the protein and the target peptide, suggesting a completely novel regulation for target proteins that constitutively bind CaM, such as ryanodine receptors.

2) Kovacs E(1), Harmat V(2), Tóth J(1), Vértessy BG(1), Módos K(3), Kardos J(4), Liliom K(1) FASEB J. 2010 Jun 14. [Epub ahead of print] Structure and mechanism of calmodulin binding to a signaling sphingolipid reveal new aspects of lipid-protein interactions. PMID: 20522785

(1)Institute of Enzymology, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary, (2)Protein Modelling Research Group, Hungarian Academy of Sciences-Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, (3)Institute of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary, (4)Department of Biochemistry, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

abstract:

Lipid-protein interactions are rarely characterized at a structural molecular level due to technical difficulties; however, the biological significance of understanding the mechanism of these interactions is outstanding. In this report, we provide mechanistic insight into the inhibitory complex formation of the lipid mediator sphingosylphosphorylcholine with calmodulin, the most central and ubiquitous regulator protein in calcium signaling. We applied crystallographic, thermodynamic, kinetic, and spectroscopic approaches using purified bovine calmodulin and bovine cerebral microsomal fraction to arrive at our conclusions. Here we present 1) a 1.6-Å resolution crystal structure of their complex, in which the sphingolipid occupies the conventional hydrophobic binding site on calmodulin; 2) a peculiar stoichiometry-dependent binding process: at low or high protein-to-lipid ratio calmodulin binds lipid micelles or a few lipid molecules in a compact globular conformation, respectively, and 3) evidence that the sphingolipid displaces calmodulin from its targets on cerebral microsomes. We have ascertained the specificity of the interaction using structurally related lipids as controls. Our observations reveal the structural basis of selective calmodulin inhibition by the sphingolipid. On the basis of the crystallographic and biophysical characterization of the calmodulin-sphingosylphosphorylcholine interaction, we propose a novel lipid-protein binding model, which might be applicable to other interactions as well.

- A kiadók nevei, ahol a cikkek megjelentek:

- 1) American Society for Biochemistry and Molecular Biology
- 2) The Federation of American Societies for Experimental Biology

- A kiadások teljes költségei:

- 1) USD 1185 = kb 260700 Ft
- 2) USD 3270 = kb 719400 Ft

- A megpályázott összeg a két cikk kiadásának teljes költsége: 980,000 Ft azaz Kilencszáznyolcvanezer forint.

- A megjelenések időpontjai:

- 1) 2010. 01. 15.
- 2) 2010. októberi szám

- Csatlakozó pályázat, amelyben a cikk létrejött: K61501, címe: Szfingozin-1-foszfát: Intracelluláris célfehérjék és plazma-membrán transzport azonosítása, futamidő: 2006. 02. 01. - 2010. 01. 31., vezető kutató: Liliom Károly

Sem OTKA, sem más pályázatot még nem pályáztam ezeknek a cikkeknek a kiadására. A K61501 pályázatom idén sikerrel lezárult. A pályázat témájában a munka keretei között három másik publikáció is született (Biochemical Journal 2008, Biochemistry 2009 és BBRC 2010). A két legfontosabb publikációt azonban a K61501 pályázatom lezárása után közölték, illetve a kiadói díjakat később számlázták. Ezek a cikkek a szakma neves és magas impaktú újságjaiban jelentek meg. A FASEB J cikk kiadását a kristályszerkezeti színes ábrák drágították. Jelen kutatási OTKA pályázatom terhére nem tudom a költséget elszámolni, mert ez lehetetlenné tenné az új témában a publikációk költségeik vállalását.

Tisztelettel köszönöm az OTKA támogatását!