

**A HUMÁN WFIKKN1 FEHÉRJE
MÁSODIK KUNITZ-TÍPUSÚ PEPTIDÁZ INHIBITOR
DOMÉNJÉNEK SZERKEZETI ÉS FUNKCIONÁLIS
JELLEMZÉSE**

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

Nagy Alinda

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológia Doktori Iskola, Klasszikus és molekuláris genetika program

Témavezető: Dr. Patthy László

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet
Budapest, 2007

BEVEZETÉS

A Humán Genom Projekt befejeződése óta a biológiai kutatások egyik alapvető feladata az emberi genom szekvenciájának elemzésével valamennyi emberi gén azonosítása, és a gének által kódolt fehérjék szerkezetének, molekuláris funkciójának és biológiai szerepének jellemzése. Orvosbiológiai és gyógyszerfejlesztési szempontból kiemelt csoportot jelentenek a peptidázok működését szabályozó inhibitorok, mivel ezek számos betegség kialakulásában játszanak szerepet.

2001-ben az MTA SZBK Enzimológiai Intézetének Funkcionális genomika csoportja bioinformatikai módszerekkel azonosította a humán 16-os kromoszómán a *WFIKKN1* gént, amely egy szekretált multidomén fehérjét kódol. A *WFIKKN1* fehérje egy WAP-, egy follisztatin-, egy immunoglobulin-, két Kunitz-típusú és egy NTR-modul családhoz tartozó domént tartalmaz. Az újonnan azonosított fehérje pontos biológiai funkciója nem ismert, azonban olyan doménekből áll, amelyek gyakran vesznek részt különböző szerin illetve metallopeptidázok gátlásában. A homológiák alapján feltételezhető volt, hogy a *WFIKKN1* fehérje egy multivalens peptidáz inhibitor.

A Funkcionális genomika csoport 2002-ben a humán 17-es kromoszómán azonosította a *WFIKKN1* fehérjével azonos doménszerkezettel rendelkező *WFIKKN2* fehérjét kódoló gént. A megegyező doménszerkezet alapján feltételezhető volt, hogy a *WFIKKN2* fehérje is multivalens peptidáz inhibitor, ugyanakkor mivel a két fehérje szöveti expressziós mintázata jelentős eltérést mutat, valószínűsíthető volt, hogy a biológiai szerepük eltérő. Míg a *WFIKKN1* gén a felnőtt szövetek közül elsősorban a hasnyálmirigyben, a májban és a csecsemőmirigyben expresszálódik, az agyban és a petefészekben pedig nem, a *WFIKKN2* gén jelentős expressziót mutatott a petefészekben, a herében és az agyban, a májban viszont nem találtak expressziót.

CÉLKITŰZÉSEK

A WFIKKN1 fehérje biológiai szerepe nem ismert, ugyanakkor a doménszerkezete alapján feltételezhető volt, hogy többféle peptidáz gátlására képes inhibitor. A kutatásaink célja a humán WFIKKN1 fehérje szerkezeti és funkcionális jellemzése, és célpeptidázainak azonosítása a fehérje rekombináns peptidáz inhibitor moduljait felhasználva.

Ennek keretében a doktori munkám célja a WFIKKN1 fehérje második Kunitz-típusú peptidáz inhibitor doménjének szerkezeti és funkcionális jellemzése volt, hogy ezáltal közelebb kerülhessünk a WFIKKN1 fehérje biológiai szerepének és orvosbiológiai jelentőségének megértéséhez.

A munka tervezett lépései:

1. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén előállítása.
2. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén inhibitor aktivitásának vizsgálata és célpeptidázainak azonosítása.
3. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén atomi szintű térszerkezetének meghatározása NMR-spektroszkópia segítségével.
4. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén szerkezeti és funkcionális jellemzőinek elemzése, és következtetés a WFIKKN1 fehérje biológiai szerepére.

MÓDSZEREK

Klónozás: A WFIKKN1-KU2 domént kódoló DNS szakaszt tartalmazó pMed23 és pPICZ α A expressziós vektor konstrukciókat standard rekombináns DNS technológiai módszerekkel állítottam elő.

A fehérjék expressziója és tisztítása: A rekombináns fehérje expressziója *Escherichia coli* JM109 és *Pichia pastoris* GS115 sejtekben történt. A fehérjék tisztítását gélfiltrációs, és nikkel- illetve tripszin-Sepharose affinitás kromatográfiával végeztem.

Fehérje szekvenálás: A megtisztított fehérjék N-terminális szekvenálását egy PE-Applied Biosystems Ltd Procise fehérjeszekvenáló rendszerrel végeztük (Dr. Patthy András, Gödöllő).

Tricin/SDS poliakrilamid gélelektroforézis: A fehérjeminták összetételének elemzéséhez 16%-os slab géleket használtam redukáló és nem-redukáló körülmények között.

Spektrofotometria: A rekombináns WFIKKN1-KU2 domének koncentrációját spektrofotometriásan határoztam meg $14300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficiens használva.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia: A rekombináns fehérje CD spektrumait 190-250 nm közötti hullámhossztartományban, JASCO J-720 spektropolariméterrel vettem fel. A méréseket 0,1 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldattal, 10 mM Tris/HCl pH 8,0 pufferben, 25 °C-on végeztem. A fehérje másodlagos szerkezetét a CD spektrumok alapján a CDPro szoftverrel határoztam meg. A rekombináns fehérje hődenaturációját 203 nm-en követtem, a 40-90 °C közötti tartományban, majd az átmeneti hőmérsékleteket a görbék elsőrendű deriváltjaiból határoztam meg, a spektropolariméter spektrum analízis programjának segítségével.

Enzimkinetikai vizsgálatok: A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén peptidázgátló hatását tripszinnel, elasztázzal, kimotripszinnel, plazminnal, trombinnal, szöveti plazminogén aktivátorral, plazma kallikreinnel, pankreatikus kallikreinnel, tüdő triptázzal és urokinázzal szemben vizsgáltam. A peptidázok szintetikus peptid-p-nitroanalid szubsztrátokkal szembeni aktivitását Cary 300 Scan spektrofotométerrel követtem 410 nm-

es hullámhosszon, 37 °C-on ($\Delta\varepsilon=8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), és meghatároztam a reakciók kezdeti sebességét. A tripszin-inhibitor komplex disszociációs állandóját (K_i) az inhibitor koncentrációk függvényében a látszólagos K_m értékek ábrázolásával határoztam meg.

Szekvencia elemzések: A Kunitz-domének aminosav szekvenciáinak többszörös illesztéséhez a CLUSTAL W programot használtam.

Mágneses magrezonancia (NMR) vizsgálatok: Az NMR spektrumokat (Gottfried Ötting, Canberra) a rekombináns WFIKKN1-KU2 fehérje 1,1 mM koncentrációjú, 90% H₂O/10% D₂O oldószerben készült oldatával, egy Varian Inova 800 MHz NMR spektrométeren vettük fel, pH 4,5-n és 25 °C-on. A domén NMR szerkezetét a DYANA program használatával számoltuk ki, a konformerek szerkezetét az OPAL programmal finomítottuk tovább, a kapott konformerek minőségét a PROCHECK-NMR-rel ellenőriztük, a RMSD (Root Mean Square Deviation) értékeket a MOLMOL programmal számoltuk ki.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

1. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén szerkezeti jellemzése

1.1. A WFIKKN1-KU2 domén CD spektruma alapján megállapítottuk, hogy a domén a Kunitz-domén család többi tagjához hasonló másodlagos szerkezeti elemekkel rendelkezik. A rekombináns domén hőstabilitása alacsonyabb más Kunitz-doménéknél: 61 °C-os olvadásponttal rendelkezik.

1.2. Az NMR-vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy a humán WFIKKN1-KU2 domén szerkezete nagyon hasonlít a BPTI Kunitz-doménjének szerkezetére, a két fehérje szerkezete közötti hasonlóság 0.9 Å értékű gerinc RMSD értékkel jellemezhető. A két fehérjében főként a peptidázkötő hurkok nagyon hasonlóak. Az NMR-vizsgálatok tehát

kimutatták, hogy a WFIKKN1-KU2 domén szerkezete közeli rokonságban áll a Kunitz-típusú peptidáz inhibitorokéval.

2. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén funkcionális jellemzése

2.1. Az enzimkinetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a WFIKKN1-KU2 domén gátolja a tripszint. A tripszinnel alkotott komplex disszociációs állandója (K_i) $9,6 \times 10^{-9}$ M, ez több nagyságrenddel kisebb, mint a BPTI-tripszin komplexé ($K_i = 1,6 \times 10^{-13}$ M). A WFIKKN1-KU2 domén tripszinnel szembeni affinitása gyengébb, mint más Kunitz-típusú inhibitorok affinitása saját célpeptidázaik iránt, azok ugyanis az általuk gátolt enzimmel általában nagyon szoros komplexet alkotnak pikomoláris (pM) nagyságrendű kötési állandókkal.

2.2. Az enzimkinetikai vizsgálatok szintén kimutatták, hogy a WFIKKN1-KU2 domén erős tripszin specificitással rendelkezik. Az inhibitor $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva teljesen megszüntette a tripszin aktivitását (30 nm kezdeti enzim koncentráció mellett), ugyanakkor a plazmin, a tüdő triptáz, a plazma kallikrein, a trombin, az urokináz, a szöveti plazminogén aktivátor, a hasnyálmirigy kallikrein, a kimotripszin és az elasztáz szerin peptidáz enzimek esetében nem volt észrevehető gátlás azonos nagyságrendű enzim koncentráció mellett. A Kunitz-típusú domének között ritka az ilyen kifejezett tripszin specificitás, általában jóval szélesebb specificitással rendelkeznek, a tripszinen kívül többféle szerin peptidázt képesek gátolni.

3. A rekombináns WFIKKN1-KU2 domén szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálata

3.1. Összehasonlítva a WFIKKN1-KU2 domén meghatározott térszerkezetét más Kunitz-típusú inhibitorok tripszinnel alkotott komplexének ismert térszerkezetével megállapítottuk, hogy a WFIKKN1-KU2 domén P2' helyén található nagyméretű Trp22 aminosav oldallánc gátolja egy a peptidázokra és inhibitoraikra jellemző erős kölcsönhatás kialakulását.

Valószínű, hogy a tripszin gátlás gyengeségét a Trp22 oldallánc kedvezőtlen konformációja okozza.

3.2. A makákó, az egér, a patkány, a marha, a kutya és a csirke WFIKKN1-KU2 doménjeiben a P1 aminosav Gln. A BPTI-ben a P1 helyen a Lys > Gln szubsztitúció csaknem öt nagyságrenddel csökkenti a tripszinnel való asszociáció erősségét, így a P1 helyen lévő Gln aminosav valószínűleg a WFIKKN1-KU2 domén tripszin gátlását is nagymértékben csökkenti. Az összes Kunitz-típusú inhibitor közül, amelyeknek meghatározták a 3D szerkezetét, csak a β 2 bungarotoxin Kunitz-típusú doménjében található Gln a P1 helyen. A β 2 bungarotoxin egy heterodimer neurotoxin, amelynek 2-es láncja nem peptidáz inhibitorként, hanem K^+ -csatorna kötő alegységként működik.

KÖVETKEZTETÉSEK

A funkcionális vizsgálatok során a rekombináns humán WFIKKN1-KU2 domén erős tripszin specificitást mutatott, ugyanakkor eredményeink (2.1 és 3.2 rész) arra utalnak, hogy nem a tripszin vagy más tripszinszerű szerin peptidáz gátlása lehet a domén biológiai funkciója. 2003-ban J. Hill és munkatársai a humán WFIKKN2 fehérje egér ortológjáról kimutatták, hogy gátolja az érett miosztatin biológiai aktivitását. A miosztatin a TGF β szupercsalád izom-specifikus tagja, amely fontos szerepet játszik az izomnövekedés negatív szabályozásában. A humán WFIKKN1-KU2 domén szerkezeti és funkcionális vizsgálatának eredményei és a WFIKKN2 fehérje megfigyelt miosztatin-kötő funkciója alapján elvetettük azt a korábbi – a fehérje doménösszetételén alapult – feltevést, hogy a WFIKKN1 fehérje fő biológiai szerepét multivalens peptidáz inhibitorként tölti be. Valószínűnek tűnik, hogy a homológ WFIKKN2 fehérjéhez hasonlóan valamely TGF β növekedési faktor családba tartozó fehérje aktivitásának szabályozásában játszik szerepet.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Nagy, A., Trexler, M. and Patthy, L. (2003) Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2101-7.

Liepinsh, E., **Nagy, A.**, Trexler, M., Patthy, L. and Otting, G. (2006) Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein. *J. Biomol. NMR* **35**, 73-8.

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Tordai, H., **Nagy, A.**, Farkas, K., Banyai, L. and Patthy, L. (2005) Modules, multidomain proteins and organismic complexity. *FEBS J.* **272**, 5064-78.

Tress, M.L., Martelli, P.L., Frankish, A., Reeves, G., Wesselink, J.J., Yeats, C., Olason, P.I., Albrecht, M., Hegyi, H., Giorgetti, A., Raimondo, D., Lagarde, J., Laskowski, R., Lopez, G., Sadowski, M.I., Watson, J., Fariselli, P., Rossi, I., **Nagy, A.**, Kai, W., Størling, Z., Orsini, M., Assenov, Y., Blankenburg, H., Huthmacher, C., Ramirez, F., Schlicker, A., Denoued, F., Jones, P., Kerrien, S., Orchard, S., Birney, E., Brunak, S., Casadio, R., Guigo, R., Harrow, J., Hermjakob, H., Jones, D.T., Lengauer, T., Orengo, C., Patthy, L., Thornton, J., Tramontano, A. and Valencia, A. (2007) The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)