

A HUMÁN WFIKKN1 FEHÉRJE FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Kondás Katalin

Témavezető: Prof. Dr. Patthy László

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti biokémia program

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet
Budapest, 2011

Bevezetés

Az MTA SZBK Enzimológiai Intézetének Funkcionális genomika csoportja génkereső programok és érzékeny homológia detektálási eljárások alkalmazásával azonosított két rokon, extracelluláris, multidomén fehérjét kódoló genomikus régiót a humán 16-os és 17-es kromoszómán. A fehérjék tartalmaznak egy WAP-, egy follisztatin-, egy immunoglobulin-, két tandem Kunitz-típusú- és egy netrin-domént. Mivel a fehérjéket felépítő domének közül a WAP-, a follisztatin- és a Kunitz-domének gyakran fordulnak elő szerin peptidáz, míg a NTR-domén metallopeptidáz inhibitorokban, ezért feltételezhető volt, hogy a WFIKKN fehérjék multivalens peptidáz inhibitorok.

A közelmúltban munkacsopotunk a WFIKKN1 fehérje második Kunitz-típusú doménjéről kimutatta, hogy tripszin specifikus inhibitor, azonban a szerkezeti és evolúciós vizsgálatok eredményei alapján elvetették azt a feltételezést, hogy a KU2-doménnek az elsődleges feladata a tripszin gátlás lenne.

A WFIKKN fehérjék biológiai szerepének tisztázására irányuló vizsgálatokban új irányt nyitott Hill és munkatársainak 2003-ban közölt eredménye. A humán WFIKKN2 fehérjéről kimutatták, hogy gátolja a TGF β növekedési faktor családba tartozó GDF8 és GDF11 növekedési faktorok biológiai aktivitását.

Ezen eredmények alapján tehát feltételezhető, hogy a humán WFIKKN1 fehérje biológiai funkciója – a paralóg WFIKKN2 fehérjéhez hasonlóan – valamely TGF β családba tartozó növekedési faktor aktivitásának a szabályozása.

Célkitűzések

A doktori munkám fő célja a WFIKKN1 fehérje kölcsönható partnereinek azonosítása a TGF β növekedési faktor családon belül, és a kölcsönhatások jellemzése, biológiai jelentőségének vizsgálata.

A munka tervezett lépései:

1. A WFIKKN1 fehérje különböző doménvariánsainak rekombináns úton történő előállítása.
2. A rekombináns WFIKKN1 fehérje és a TGF β családtagok közötti kölcsönhatások vizsgálata, a kölcsönhatások kinetikai paramétereinek meghatározása.
3. A WFIKKN1 fehérje hatásának vizsgálata a növekedési faktorok receptorkötésére SPR oldatfázisú kompetíciós vizsgálatokkal. A vizsgálatokhoz a receptorok extracelluláris doménjeinek rekombináns úton történő előállítása.
4. A WFIKKN1 fehérje hatásának vizsgálata a növekedési faktorok biológiai aktivitására luciferáz riporter gén vizsgálatokkal.

Alkalmazott módszerek

A WFIKKN1 fehérje KU2-NTR doménvariánsát és a receptorok extracelluláris doménjeit kódoló DNS szakaszt tartalmazó pPICZ α A expressziós vektor konstrukciókat standard rekombináns DNS technológiai módszerekkel állítottam elő. A rekombináns fehérjék expressziója *Pichia pastoris* GS115 törzsben történt. Az expresszált fehérjék tisztítását gélfiltrálással és nikkell-affinitás kromatográfiával végeztem. A rekombináns WFIKKN1 fehérjét *Drosophila melanogaster* S2 sejtekben, a rekombináns GDF8 prodomént *Escherichia coli* BL21 sejtekben, a WFIKKN1 fehérje WAP-FS, FS, KU1-KU2, NTR rekombináns doménvariánsait *Pichia pastoris* GS115 törzsben Trexler Mária állította elő. A növekedési faktorokat az R&D Systems-től vásároltuk.

A fehérjeminták összetételének elemzéséhez a fehérje méretétől függően 11-22%-os lineáris poliakrilamid-grádiens géleket vagy 16%-os poliakrilamid géleket használtunk redukáló és nem redukáló körülmények között.

A moláris extinkciós együtthatókat és a molekulatömegeket az online fehérjeelemző ProtParam programmal számoltam.

A tisztított rekombináns fehérjék moláris koncentrációját spektrofotometriásan határoztam meg.

A rekombináns monomer fehérjék szerkezeti integritását Applied Biosystems 471A fehérje szekvenáló készüléken végzett N-terminális szekvenálással, illetve JASCO J-720 spektropolariméteren felvett CD spektrumokkal ellenőriztük. A rekombináns fehérjék olvadási hőmérsékletét a hődenaturációs görbék elsőrendű deriváltjából határoztam meg a spektropolariméter spektrum analízis programjával.

A fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokat felületi plazmon rezonancia (SPR) analízissel végeztem BIAcore X műszeren. Az SPR mérésekhez CM5 szenzorchipet, a kinetikai paraméterek meghatározásához a BIAevaluation 4.0 szoftvert használtam.

A WFIKKN1 fehérjének, és doménvariánsainak a növekedési faktorok receptorkötésére gyakorolt gátló hatását SPR oldatfázisú kompetíciós kísérletekkel vizsgáltam.

A WFIKKN1 fehérjének a növekedési faktorok aktivitására gyakorolt hatását luciferáz riporter gén vizsgálatokban vizsgáltuk. A GDF8, GDF11 növekedési faktorok aktivitás mérése Cignal SMAD Firefly luciferáz riporter vektorral és Renilla luciferáz kontroll vektorral transziensen transzfektált Rhabdomyosarcoma A204-sejtvonalon, a BMP2, BMP4 aktivitás mérése BRE-Luc riporter vektorral stabilan transzfektált HepG2-BRA-sejtvonalon, a TGF β 1 aktivitás mérése a PAI-1 promoter/Firefly luciferáz vektorral stabilan transzfektált MLEC-clone32-sejtvonalon történt. A luciferáz aktivitást Appliskan luminométeren mértük.

Eredmények

1. A WFIKKN1 és a GDF8, GDF11 növekedési faktorok közötti kölcsönhatás jellemzése

1.1 Felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel kimutattam, hogy a WFIKKN1 fehérje erős kölcsönhatást alakít ki a GDF8 növekedési faktoral, a számított egyensúlyi disszociációs állandó $3,35 \times 10^{-8}$ M. Domén-szinten a WFIKKN1 fehérje a follisztatin-doménjével ($K_d: 2,71 \times 10^{-7}$ M) erős, míg a netrin-doménjével ($K_d: 2,38 \times 10^{-6}$ M) gyengébb kötéssel kötődik a növekedési faktorhoz.

1.2 A WFIKKN1 a GDF8 prodoménhez is kötődik ($K_d: 4,85 \times 10^{-7}$ M). Az adatok alapján ez a kölcsönhatás kb. tizenötször gyengébb, mint ami a GDF8 növekedési faktor és a WFIKKN1 fehérje között kialakul. Ezt a kölcsönhatást a netrin-domén közvetíti ($K_d: 1,6 \times 10^{-7}$ M).

1.3 A WFIKKN1 fehérje a GDF8 rokon GDF11 növekedési faktort is nagy affinitással köti. A WFIKKN1 és a GDF11 növekedési faktor kölcsönhatására számított egyensúlyi disszociációs állandó $2,25 \times 10^{-9}$ M.

2. A WFIKKN1 és a GDF8, GDF11 fehérjék közötti kölcsönhatás biológiai jelentőségének vizsgálata

2.1 A GDF8 növekedési faktor a jelátviteli útvonal beindításához az aktivin II-es típusú receptorokhoz (elsősorban az ACVRIIB-hez) kötődik. Az SPR oldatfázisú kompetíciós kísérletekhez *Pichia pastoris* expressziós rendszerben előállítottam az ACVRIIB extracelluláris doménjét. A kompetíciós kísérletek alapján a WFIKKN1 fehérje a GDF8 és receptora közötti kölcsönhatást koncentrációfüggő módon gátolta. Domén-szinten a gátlásban a WFIKKN1 fehérje netrin-doménjének nincs szerepe, azt a follisztatin-doménje közvetíti.

2.2 Luciferáz riporter gén vizsgálatokban a WFIKKN1 fehérje nanomoláris koncentrációtartományban gátolta a GDF8 és a GDF11 növekedési faktorok aktivitását: 0,8

nM GDF8 mellett a WFIKKN1 fehérje fél maximális gátlása 6 nM-ra becsülhető, illetve 0,8 nM GDF11 aktivitását 50 nM WFIKKN1 ~ 20%-ra csökkentette.

3. A WFIKKN1 és a BMP2, BMP4, TGFβ1, aktivin A, BMP3 és BMP8b fehérjék közötti kölcsönhatás jellemzése

3.1 SPR kölcsönhatás vizsgálatok alapján a WFIKKN1 fehérje a BMP2 (K_d : $7,25 \times 10^{-7}$ M), a BMP4 (K_d : $8,2 \times 10^{-7}$ M) és a TGFβ1 (K_{d1} : $4,5 \times 10^{-7}$ M; K_{d2} : $8,93 \times 10^{-5}$) növekedési faktorokhoz közel azonos erősséggel, de a GDF8, GDF11 fehérjékhez képest sokkal kisebb affinitással kötődik. A BMP3 (K_d : $3,37 \times 10^{-6}$ M), a BMP8b (K_d : $3,06 \times 10^{-5}$ M) fehérjékhez csak nagyon gyengén kötődik. Az aktivin A esetén kölcsönhatás nem volt detektálható.

4. A WFIKKN1 és a BMP2, BMP4, TGFβ1 növekedési faktorok közötti kölcsönhatás biológiai jelentőségének vizsgálata

4.1 A BMP2, BMP4 növekedési faktorok a BMP I-es típusú receptorokhoz kötődnek. Az SPR oldatfázisú kompetíciós kísérletekhez *Pichia pastoris* expressziós rendszerben előállítottam a BMPRIA extracelluláris doménjét. A kompetíciós kísérletek alapján a WFIKKN1 csak nagyon gyengén gátolja a BMP2 és a BMP4 növekedési faktorok receptorkötését.

4.2 Luciferáz riporer gén vizsgálatok eredményei alapján, a WFIKKN1 fehérje a BMP2, a BMP4 és a TGFβ1 növekedési faktorok aktivitására még mikromoláris koncentrációtartományban sincs hatással.

Következtetések

A humán WFIKKN1 fehérje, a homológ humán WFIKKN2 fehérjéhez hasonlóan, specifikusan gátolja a GDF8 és a GDF11 növekedési faktorok aktivitását és fontos szerepet játszik a növekedési faktorok által kontrollált biológiai folyamatok szabályozásában.

A BMP2, a BMP4 és a TGF β 1 növekedési faktorok esetén feltételezhető, hogy a WFIKKN1 fehérje, mint növekedési faktor kötő fehérje funkcionál. A WFIKKN1 fehérje kötésével lokalizálhatja a növekedési faktorok működését, és ezáltal elősegítheti a növekedési faktor gradiensek létrejöttét az extracelluláris térben.

Ezen eredmények alapján a WFIKKN1 és a WFIKKN2 fehérjék funkciójában jelentős átfedés van: mindkét fehérje specifikusan gátolja a GDF8 és a GDF11 aktivitását, és egyik fehérje sincs hatással az aktivin A és a TGF β 1 növekedési faktorok aktivitására luciferáz riporter gén vizsgálatokban. Mivel a humán WFIKKN fehérjék expressziós mintázata jelentős eltérést mutat, ezért valószínűnek tűnik, hogy a fehérjék funkcionális különbsége inkább az expressziós mintázat, mint a ligand-specifitás szintjén valósul meg: a WFIKKN1 és a WFIKKN2 expressziós mintázata határozza meg, hogy egy adott szövetben melyik fehérje játszik szerepet a növekedési faktorok aktivitásának szabályozásában.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Kondás K., Szláma G., Trexler M. and Patthy L. (2008) Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for Growth and Differentiation Factors 8 and 11. *J. Biol. Chem.* **283**, 23677-23684.

Szláma G., Kondás K., Trexler M. and Patthy L. (2010) WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGF β 1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. *FEBS J.* **277**, 5040-5050.