

# **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 $\beta$  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 $\beta$  családba tartozó növekedési faktor aktivitásának a szabályozása.

## Célkitűzések

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

A munka tervezett lépései:

1. A WFIKKN1 fehérje különböző doménvariánsainak rekombináns úton történő előállítás.
2. A rekombináns WFIKKN1 fehérje és a TGF $\beta$  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 előállítás.
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 pPICZaA 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 nikkel-affinitás kromatográfiával végeztem. A rekombináns WFIKKN1 fehérjét *Drosophila melanogaster* S2 sejtekben, a rekombináns GDF8 prodóment *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 végezett 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 riportter gén vizsgálatokban vizsgáltuk. A GDF8, GDF11 növekedési faktorok aktivitás mérése Signal SMAD Firefly luciferáz riportter vektorral és Renilla luciferáz kontroll vektorral tranziensen transzfektált Rhabdomyosarcoma A204-sejtvonalon, a BMP2, BMP4 aktivitás mérése BRE-Luc riportter vektorral stabilan transzfektált HepG2-BRA-sejtvonalon, a TGF $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. *FEBS J.* **277**, 5040-5050.