

Az emlős peroxidazin fehérje szerkezet-funkció vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Lázár Enikő Marina

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Geiszt Miklós, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szakács Gergely, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sarkadi Balázs, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Cervenak László, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Nagy Péter, Ph.D., tudományos osztályvezető

Budapest
2016

1. TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| 1. TARTALOMJEGYZÉK | 1 |
| 2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE..... | 5 |
| 3. BEVEZETÉS..... | 8 |
| 3.1. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) biológiája | 9 |
| 3.1.1. A reaktív oxigénszármazékok általános jellemzése | 9 |
| 3.1.2. A ROS metabolizmusa emlős sejtekben..... | 12 |
| 3.1.3. A NADPH-oxidázok családja..... | 14 |
| 3.1.4. Peroxidáz enzimek..... | 16 |
| 3.2. Az emlős hem-peroxidázok családja | 17 |
| 3.2.1. Az állati hem-peroxidázok általános jellemzői | 18 |
| 3.2.1.1. Az állati hem-peroxidázok szerkezete | 18 |
| 3.2.1.2. Az állati hem-peroxidázok katalitikus ciklusa | 19 |
| 3.2.1.3. Az emlős hem-peroxidázok működésének élettani jelentősége | 21 |
| 3.2.2. A mieloperoxidáz (MPO) | 21 |
| 3.2.3. Az eozinofil peroxidáz (EPX) | 24 |
| 3.2.4. A laktoperoxidáz (LPO) | 25 |
| 3.2.5. A tireoperoxidáz (TPO) | 26 |
| 3.2.6. A ciklooxygenáz 1 és 2 (COX1 és COX2)..... | 27 |
| 3.2.7. A peroxidazin (PXDN)..... | 28 |
| 3.2.7.1. A PXDN szerkezete és sejtszintű lokalizációja..... | 29 |
| 3.2.7.2. A PXDN enzimaktivitásának jellemzői..... | 30 |
| 3.2.7.3. A PXDN szerepe alacsonyabbrendű élőlényekben | 31 |
| 3.2.7.4. A PXDN ismert funkciói emlős szervezetekben | 32 |
| 3.2.8. A peroxidazin-szerű fehérje (PXDNL)..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.2.9. Az emlős hem-peroxidázok és NADPH-oxidázok együttműködése..... | 34 |
| 3.3. Az extracelluláris mátrix (ECM) és a bazális membránok..... | 35 |
| 3.3.1. Az ECM általános jellemzői..... | 35 |
| 3.3.2. Az ECM fajtái és összetétele..... | 37 |
| 3.3.3. A bazális membránok szerkezetének kialakulása..... | 40 |
| 3.3.4. A bazális membránok fiziológias funkciói és kórélettani eltérései..... | 44 |
| 3.4. Állati hem-peroxidáz enzimek szerepe az ECM szintézisében..... | 45 |
| 4. CÉLKITŰZÉSEK..... | 49 |
| 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK..... | 50 |
| 5.1. Rekombináns humán PXDN és PXDNL konstruktok klónozása..... | 50 |
| 5.2. PXDN-hiányos egértörzs készítése és tenyésztése..... | 51 |
| 5.3. Sejttenyésztés és sejt kultúrán végzett kísérletek..... | 54 |
| 5.4. Primer antitestek..... | 55 |
| 5.4.1. Kereskedelmi forgalomban kapható antitestek..... | 55 |
| 5.4.2. Saját fejlesztésű PXDN-specifikus antitestek..... | 55 |
| 5.5. A PXDN oligomerizációjának vizsgálata..... | 56 |
| 5.6. A kollagén IV profil és NC1 keresztkötés vizsgálata..... | 57 |
| 5.7. A PXDN szekrécijának vizsgálata..... | 58 |
| 5.8. Western blot és immunprecipitáció..... | 59 |
| 5.9. Tömegspektrometriai analízis..... | 60 |
| 5.10. Immunfluoreszcens jelölések és konfokális mikroszkópia..... | 61 |
| 5.11. Peroxidázaktivitás mérése..... | 62 |
| 5.12. Többszörös aminosavszekvencia-illesztés..... | 62 |
| 5.13. Statisztikai analízis..... | 63 |
| 6. EREDMÉNYEK..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 6.1. Az endogén emlős PXDN szerepének vizsgálata a bazális membránok kollagén IV hálózatának szintézisében..... | 64 |
| 6.1.1. A PXDN részvételének elemzése HUVEC sejtek kollagén IV keresztkötésében | 64 |
| 6.1.2. Kollagén IV keresztkötés detektálása vad típusú és PXDN génhíányos MEF sejtekben | 67 |
| 6.2. A PXDN negyedleges szerkezetének elemzése..... | 69 |
| 6.2.1. Az emlős PXDN redukcióra érzékeny homotrimert formál | 69 |
| 6.2.2. A PXDN enzimaktivitása és trimerizációja közötti kapcsolat vizsgálata..... | 74 |
| 6.2.3. A PXDN trimerformálásában szerepet játszó molekulaszakaszok azonosítása ... | 76 |
| 6.2.4. A PXDN homotrimert stabilizáló diszulfidhidak pozíciójának vizsgálata..... | 77 |
| 6.2.4.1. A PXDN fehérjeláncon belül diszulfidhidat nem képző ciszteinek azonosítása többszörös szekvenciaillesztéssel | 78 |
| 6.2.4.2. A fehérjeláncon belül diszulfidhidat nem képző ciszteinek közreműködésének vizsgálata a PXDN oligomerformálásában | 80 |
| 6.2.4.3. A trimerizációban résztvevő ciszteinek konzerváltságának vizsgálata fajok közötti homológiakereséssel..... | 82 |
| 6.3. Az ismert PXDN funkciók szerkezeti követelményeinek vizsgálata | 83 |
| 6.3.1. A PXDN <i>in vitro</i> peroxidázaktivitásának szerkezetfüggése..... | 84 |
| 6.3.2. A PXDN kollagén IV keresztkötő aktivitásának strukturális feltételei..... | 86 |
| 6.3.3. A PXDN szekréciónak szekvenciakövetelményei..... | 88 |
| 6.3.4. Rekombináns PXDN konstruktok szubcelluláris elhelyezkedésének összehasonlítása..... | 90 |
| 6.4. A PXDNL szerkezeti jellemzőinek és lokalizációjának vizsgálata..... | 93 |
| 6.4.1. A PXDN trimerizációjáért felelős ciszteinek konzerváltságának vizsgálata a PXDNL szekvenciájában..... | 93 |
| 6.4.2. A rekombináns PXDNL lokalizációjának vizsgálata | 94 |
| 7. MEGBESZÉLÉS | 96 |

| | |
|--|-----|
| 7.1. Az emlős PXDN szerepe a kollagén IV hálózat kialakításában..... | 96 |
| 7.2. A PXDN oligomerizációjának mechanizmusa | 99 |
| 7.3. A PXDN ismert működéseinek szerkezeti feltételei | 104 |
| 7.4. A PXDNL szekvencia- és lokalizációvizsgálata | 110 |
| 8. KÖVETKEZTETÉSEK..... | 113 |
| 9. ÖSSZEFOGLALÁS | 114 |
| 10. SUMMARY | 115 |
| 11. IRODALOMJEGYZÉK..... | 116 |
| 12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE | 134 |
| 13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 135 |

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADAM – dezintegráló és metalloproteináz enzim
ADAMTS – dezintegráló és metalloproteináz enzim trombospondin motívummal
ASD – anterior szegment diszgenezis
ATCC – American Type Culture Collection
BSA – borjúsérumból származó albumin
C-terminális – karboxi-terminális
COX1, 2 – ciklooxygenáz 1 és 2
CTAB – hexadecil-trimetil-ammónium-bromid
DAB – 3, 3'-diamino-benzidin-tetrahidroklorid
DCM – dilatatív kardiomiopátia
DMEM – Dulbecco-féle módosított Eagle médium
DOC – nátrium-deoxikolát
Duox – kettős oxidáz (dual oxidase)
DuoxA1, 2 – kettős oxidáz (dual oxidase) aktivátor 1 és 2
ECM – extracelluláris mátrix
EGF – epidermális növekedési faktor
EHS – Engelbrecht-Holm-Schwarm sejtvonal
EPX – eozinofil peroxidáz
ER – endoplazmás retikulum
Ero1 – endoplazmás retikulum oxidoreduktin 1
FAD – flavin-adenin-dinukleotid
FBS – magzati borjúsérum
G418-szulfát – geneticin
GAG – glükózaminoglikán
GBM – glomeruláris bazális membrán
GGT – γ -glutamil-transzferáz
GSH – redukált glutation
GTP – guanozin-trifoszfát
HEK293FS – HEK293 freestyle sejtek
HEPES – 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etánszulfonsav

HRP – tormaperoxidáz
HUVEC – humán umbilikális véna endotél sejt
IAA – jódacetamid
Ig C2 – immunglobulin C2-szerű domén
iPS – indukált pluripotens őssejt
KEL – kollagenázzal emésztett sejtizátum
KO – knockout
LC-MS/MS – likvidkromatográfia-tandem tömegspektrometria
LOX – lizil-oxidáz
LOXL – lizil-oxidáz-szerű fehérje
LPO – laktoperoxidáz
LRR – leucin-gazdag ismétlődések
LUT – lookup table megjelenítés
MEF – egér embrionális fibroblaszt
MIP – maximális intenzitás projekció
MMP – mátrix metalloproteináz
MPO – mieloperoxidáz
N-terminális – amino-terminális
NADH – redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH – redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NC1 – nem kollagenózus domén 1
NEAA – nem esszenciális aminosav
NEM – N-etilmaleimid
Nox – NADPH-oxidáz
NoxA1 – NADPH-oxidáz aktivátor 1
NoxO1 – NADPH-oxidáz szabályozó 1
OPO – ovoperoxidáz
PBS – foszfát-pufferelt sóoldat
PCR – polimeráz láncreakció
PDI – protein diszulfid-izomeráz
PFA – paraformaldehid
PhG – phloroglucinol

PMSF – fenil-metil-szulfonil-fluorid
Prx4 – peroxiredoxin 4
PXDN – peroxidazin
PXDNL – peroxidazin-szerű fehérje
Pxn1, 2 – *Caenorhabditis elegans* peroxidazin 1 és 2
ROS – reaktív oxigénszármazék
s.e.m. – az átlag standard hibája
SDS – nátrium-dodecil-szulfát
SOD – szuperoxid-dizmutáz
TG – tireoglobulin
TGF β – transzformáló növekedési faktor β
TIMP – mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor
TM – transzmembrán régió
TMB – 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidin
TPO – tireoperoxidáz
Tris – trisz(hidroximetil)-amino-metán
TSL – teljes sejtlizátum
Udx1 – tengeri sünn kettős oxidáz 1
VPO1, 2 – vaszkuláris peroxidáz 1 és 2
vWF C – von Willebrand faktor C-típusú domén
WT – vad típus
ZFN – cink-ujjas endonukleáz
 β ME – β -merkaptoetanol

3. BEVEZETÉS

A reaktív oxigénszármazékokat (ROS) hosszú ideig csak a sejtek oxidatív anyagcseréjének melléktermékeként keletkező, károsító hatású molekuláknak tekintettük. Az utóbbi évtizedek intenzív kutatásainak köszönhetően azonban egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy ezek az oxigéntartalmú intermedierek számos különböző fiziológiás működésben, így a természetes immunválaszban, megtermékenyítésben, egyensúly-érzékelésben, vazoregulációban, oxigénérzékelésben, pajzsmirigyhormonszintézisben, illetve az extracelluláris mátrix (ECM) szerkezetének kialakításában is központi szereppel bírnak. Az említett folyamatokban a ROS szabályozott enzimátikus reakció során keletkezik, amiért elsősorban a NADPH-oxidáz (Nox/Duox) enzimesalád képviselői a felelősek. A Nox/Duox enzimek által katalizált reakció során közvetlenül, vagy a termelt szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$) dizmutációjával keletkező, illetve alternatív molekuláris forrásokból származó hidrogén-peroxid (H_2O_2) kiemelten nagy sejtélettani jelentőséggel bír. Ez a többi ROS-hoz képest hosszú féléletidejű és viszonylag stabil molekula legrészletesebben tanulmányozott hatásait peroxidáz enzimek közreműködésével fejti ki. Doktori munkám során az állati hem-peroxidázok legújabbán azonosított képviselőjének, a peroxidazinnak (PXDN) és homológjának, peroxidazin-szerű fehérjének (PXDNL) vizsgálatával foglalkoztam. A PXDN-ről a közelmúltban igazolódott, hogy az ECM speciális formáját jelentő bazális membránokban a domináns kollagén IV hálózat oxidatív keresztkötését katalizálja, ami elengedhetetlen ezen struktúrák fiziológiás szerkezetének kialakításához. A PXDNL élő szervezetben betöltött szerepe mindezidáig ismeretlen.

A bevezető fejezetben elsőként a reaktív oxigénszármazékokat és a metabolizmusukban résztvevő enzimeket mutatom be, majd az állati hem-peroxidázok általános működésének és az enzimesalád egyes képviselőinek legfontosabb jellemzőit ismertetem, különös tekintettel a PXDN-nel kapcsolatban rendelkezésünkre álló korlátozott mennyiségű irodalmi forrásra. A PXDN és a kollagén IV közötti interakció hátterének megvilágítása érdekében ezután az ECM, azon belül is a bazális membránok alkotóit, szerkezetét és funkcióit tekintem át, végül pedig egy külön alfejezetben foglalom össze eddigi ismereteinket az állati hem-peroxidázok és az ECM kapcsolatáról.

3.1. A reaktív oxigénszármazékok (ROS) biológiája

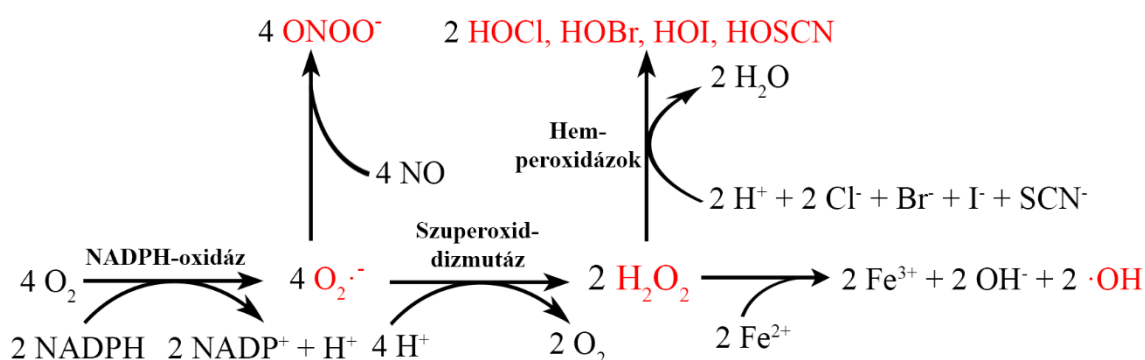
Az élőlények aerob metabolizmusának elkerülhetetlen következménye a reaktív oxigénszármazékok (ROS) képződése, aminek jelentőségét számos fiziológiás és kórélettani folyamatban igazolták az utóbbi évek kutatásai. Az élő szervezetben kialakuló oxigéntartalmú intermedierek rövid jellemzését követően a ROS-termelő és -lebontó folyamatok emlős sejtekre általánosan jellemző reakcióútjait ismertetem, majd a NADPH-oxidáz enzimesaláddal, valamint a peroxidázaktivitású fehérjékkel kapcsolatos legfontosabb ismereteinket foglalom össze.

3.1.1. A reaktív oxigénszármazékok általános jellemzése

A ROS molekuláris oxigénből (O_2) kialakuló, igen nagy reakciókészségű intermedierek összefoglaló elnevezése, melyek könnyen lépnek kölcsönhatásba a szervezetet alkotó szerves és szervesetlen molekulákkal egyaránt. Legismertebb és egyben legjobban tanulmányozott képviselőjük a szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$), ami a vegyértékhiányos párosítatlan elektront tartalmazó szabadgyök. A hasonló tulajdonságokkal rendelkező hidroxilgyök ($\cdot OH$), peroxilgyök (RO_2^{\cdot}) és alkoxilgyök (RO^{\cdot}) mellett több, kémiai jellegüket tekintve nem gyök természetű molekulát is ebbe a csoportba sorolunk, így az ózont (O_3), a szinglet oxigént (1O_2) és a hidrogén-peroxidot (H_2O_2), illetve tágabb értelemben véve a hipohalit- és pszeudohipohalit-ionokat is (OX^-).¹ Élettani szempontból nem kevésbé jelentősek egyes nitrogénatomot tartalmazó, szintén nagy reakciókészségű intermedierek (NO^{\cdot} , $\cdot NO_2$, N_2O_3 , HNO_2 , $\cdot ONOOCO_2^-$, $ONOO^-$), melyeket összefoglalóan reaktív nitrogénszármazékokként említünk.²

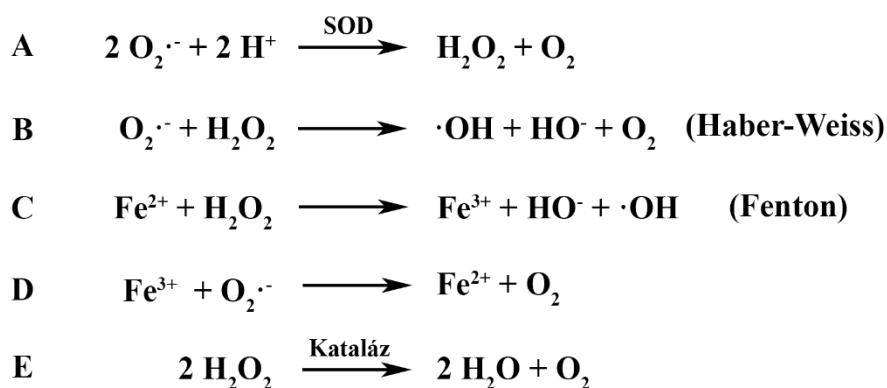
A ROS keletkezése élő szervezetben igen gyakran láncszerű folyamatban valósul meg, melynek során az egyes intermedierek megfelelő környezeti feltételek mellett spontán is hatékonyan konvertálódhatnak egymásba, bizonyos átalakulások azonban jellemzően azokra specializált enzimek közreműködésével mennek végbe (1. ábra).¹ A ROS-szintézis első lépéseként leggyakrabban $O_2^{\cdot-}$ jön létre, ami a szuperoxid-dizmutáz (SOD) által katalizált folyamatban H^+ felvételével O_2 -né és H_2O_2 -dá alakulhat (2.A ábra). A H_2O_2 és a $O_2^{\cdot-}$ kölcsönhatásából az ún. Haber-Weiss reakció során $\cdot OH$ és OH^- keletkezhet (2.B ábra). Az előbbi folyamatot kétértékű fémionok, így Fe^{2+} vagy Cu^{2+}

jelenléte jelentősen felgyorsítja, így a részvételükkel zajló katalitikus ciklus Fenton-reakciónak nevezett első lépésében a H_2O_2 -ból $\cdot\text{OH}$ és OH^- keletkezik (2.C ábra), a második lépésben pedig a $\text{O}_2^{\cdot-}$ a megelőzően háromértékűvé alakult fémion redukciójához kapcsolatosan O_2 -né alakul (2.D ábra).³ A H_2O_2 halid- és pszeudohalid-ionokkal (Cl^- , Br^- , I^- , SCN^-) peroxidáz enzimek által katalizált folyamatban reakcióba lépve hipohalogen-savakat képezhet.⁴ A $^1\text{O}_2$ az O_2 gerjesztésével, az O_3 pedig UV sugárzás hatására jöhet létre, ezen molekulák állati szervezetben történő termelődésével kapcsolatban azonban kevesebb ismerettel rendelkezünk.⁵ A reaktív nitrogénszármazékok képződésének első lépését jellemzően a peroxinitrit (ONOO^-) keletkezése jelenti, ami a $\text{O}_2^{\cdot-}$ és a nitrogénmonoxid-szintáz (NOS) által enzimatis úton képzett nitrogén-monoxid ($\text{NO}\cdot$) közötti interakció eredményeképpen jön létre, majd szinte azonnal további reaktív nitrogéntartalmú intermedierek kialakulását indítja meg.²



1. ábra: Oxigéntartalmú intermedierek keletkezése és egymásba történő átalakulásai

A termelődött ROS gyorsan reakcióba léphet a szervezet kis molekulatömegű alkotóival és makromolekuláival egyaránt, ami eltérően befolyásolhatja azok szerkezetét és funkcióját, ezáltal pedig változatos biológiai hatások kialakulásához járulhat hozzá.⁶ A különböző oxigéntartalmú intermedierek termelődésének mértéke és helye, valamint az egyes molekulák reakciókészsége és féléletideje is nagyban meghatározza az azok részvételével zajló reakciókat. A legstabilabb ROS-nak a H_2O_2 tekinthető ms-os nagyságrendbe eső féléletidejével, amíg a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ot hasonló vizsgálati rendszerben μs -os, a $\cdot\text{OH}$ -öt pedig ns-os értékek jellemzik.^{1,7}



2. ábra: A $\text{O}_2^{\cdot-}$ és a H_2O_2 eliminációjának reakcióútjai. Az $\text{O}_2^{\cdot-}$ elbontásában a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimek játszanak központi szerepet (A). A Haber-Weiss (B) és a Fenton-reakcióban (C) a $\text{O}_2^{\cdot-}$ és a H_2O_2 egymással reakcióba lépve $\cdot\text{OH}$ kialakulását teszi lehetővé. A Fe^{2+} katalitikus hatást fejt ki az említett reakció során (C, D). A H_2O_2 elbontásában kataláz enzimek is részt vesznek (E).

A ROS-kutatás korai fázisában elsősorban az oxigéntartalmú intermedierek szabályozatlan vagy túlzott mértékű termelődése által okozott molekuláris károsodások álltak a figyelem középpontjában, melyek többnyire a reakciópartnerek aspecifikus oxidációjához köthetően keletkeznek. Az így kialakuló DNS-károsodást, lipid-peroxidációt, illetve egyes fehérje és szénhidrát alkotók oxidációját a mai napig számos kóreltani folyamatban központi jelentőségű tényezőnek tartjuk.⁶ Az oxigéntartalmú intermedierekkel kapcsolatos meglehetősen egyoldalú kép kialakulását az is elősegítette, hogy az aktív antioxidáns védelmet biztosító enzimeket több évtizeddel korábban sikerült azonosítani, mint a ROS-t célzottan előállító vagy felhasználó fehérjéket.⁸ Hosszú ideig a szabályozott körülmények között termelt ROS egyetlen ismert, az élő szervezet szempontjából előnyös jellemzője antibakteriális hatása volt, aminek a természetes immunválaszban betöltött jelentősége korán igazolódott. Ma már széleskörben ismert, hogy számos más élettani jelenségben, így például a pajzsmirigyhormonok szintézisében, az oxigéntenzió érzékelésében, egyes idegrendszeri működésekben, a megtermékenyítés folyamatában, a belsőfül otolit kristályainak kialakulása során és az érfali simaizomzat szabályozásában is elengedhetetlen az oxigéntartalmú intermedierek koordinált részvétele. A többnyire egy jellegzetes sejttípusra vagy szövetre korlátozódó hatások mellett egyes, a teljes szervezetet érintő folyamatokban, így például az extracelluláris mátrixok (ECM) szintézisében is igazolódott a ROS közreműködése.⁹ Az említett példák mellett fontos kiemelni, hogy az oxigéntartalmú intermediereknek általános sejtszintű

folyamatok szabályozásában is egyre növekvő jelentőséget tulajdonítanak. Példaként említhető a mitokondriumból felszabaduló ROS szerepe az apoptózis jelpályában, vagy a H₂O₂ egyes intracelluláris fehérjék ciszteinjeinek reverzibilis oxidációján keresztül megvalósuló, jelátvitelt befolyásoló hatása.¹⁰ A ROS-kutatás igen forró területét jelenti azok intracelluláris szignalizációban betöltött szerepének vizsgálata, ami vélhetően számos új ismerettel fogja gazdagítani az oxidánsokról alkotott képünket.

3.1.2. A ROS metabolizmusa emlős sejtekben

Az előzőekben ismertetett „ROS arzenál” legtöbb tagja élő sejtekben is kialakulhat, azonban ezek mennyiségi viszonyaival kapcsolatban nem állnak rendelkezésünkre megbízható adatok. A legtöbb információval a O₂^{·-} és a H₂O₂ termelődését és lebontását eredményező folyamatokról rendelkezünk, ezért a következőkben ezekre fókuszálva tekintem át az emlős sejtek ROS metabolizmusában résztvevő enzimeket és katalitikus aktivitással nem rendelkező molekulákat.

A sejtekben termelődő ROS mennyiségi szempontból legjelentősebb forrásának a mitokondriumot tartjuk. Az itt zajló terminális oxidáció során a redukáló ekvivalensekről az elektronok a légzési lánc elemein keresztül végül O₂-re kerülnek, ami a mitokondriális mátrixban jelenlévő protonok közreműködésével víz képződéséhez vezet. A terminális oxidáció sokszor nem tökéletesen megy végbe, és az energiatermelő folyamat melléktermékeként részlegesen redukált oxigéntartalmú intermedierek, elsősorban O₂^{·-} molekulák keletkeznek.¹¹ A mitokondriális mátrixban található szuperoxid-dizmutáz izoforma, a SOD2 a kialakuló O₂^{·-}-ot H₂O₂-dá alakítja.⁸ A mitokondriumok ROS termelésének mennyiségi jellemzőivel kapcsolatban elsősorban izolált mitokondriumok vizsgálatán alapuló mérési eredmények ismertek, az élő sejtek ROS termeléséhez történő hozzájárulásuk mértékéről azonban kevesebben tudunk. A légzési lánc tagjain kívül számos más mitokondriális enzim, így a 2-oxoglutarát-dehidrogenáz, a piruvát-dehidrogenáz, a membránban található glicerin-3-foszfát-dehidrogenáz és a mitokondriális flavoprotein-ubikinon-oxidoreduktáz működése is hozzájárul a sejtorganellumra jellemző oxidatív közeg kialakításához.¹²

Szintén nagymennyiségű ROS található az endoplazmás retikulum (ER) lumenében, ahol többek között a szekrécióra kerülő fehérjék oxidatív éréséhez szükséges

enzimreakciókat H_2O_2 képződése kíséri. A proteinek harmadlagos és negyedleges szerkezetének stabilizálásában résztvevő diszulfidhidak megfelelő pozícióban történő kialakulása az ER-ban található oxidoreduktázok közreműködésével megy végbe. A folyamat egyik legfontosabb szereplője a protein diszulfid-izomeráz (PDI), ami az érésben lévő fehérje diszulfidhidjának képződését katalizáló reakció során redukált állapotba kerül. A PDI oxidált formába történő visszaalakítását az endoplazmás retikulum oxidoreduktin 1 (Ero1) fehérje végzi, a folyamat melléktermékeként pedig H_2O_2 keletkezik.¹³ Genetikai vizsgálatok azt bizonyítják, hogy az oxidatív fehérjeérés az Ero1 hiányában is végbemegy, ami további oxidoreduktázok részvételét valószínűsíti a folyamatban.¹³ A peroxiredoxin család endoplazmás retikulumban kifejeződő izoformája, a Prx4 H_2O_2 -ot felhasználva oxidálja a redukált állapotú PDI-t, így alternatív úton teszi azt képessé újabb diszulfidkötések kialakítására.¹⁴ Amíg a mitokondriumban termelt ROS a citoszolba jutva jelátvivő molekulaként funkcionálhat, az endoplazmás retikulum membránrendszere gátat szab az oxidánsok szabad diffúziójának. Ezt laborunk korábbi eredményei is alátámasztották, melyek szerint az endoplazmás retikulum lumenébe lokalizált HyPer redox szenzor erősen oxidált, a membrán külső oldalára irányított fehérje viszont a citoplazmában elhelyezkedő szondához hasonlóan redukált állapotba kerül.¹⁵

Az említettek mellett számos más enzimreakció, így például a zsírsavláncok peroxiszómában zajló β -oxidációja, a lipoxigenáz, xantin-oxidáz, citokróm p450 monooxigenáz, aminosav-oxidáz, valamint a nitrogén-monoxid-szintáz működése során is keletkeznek a sejtekben oxigéntartalmú intermedierek.¹² Egyes, katalitikus aktivitásukat az extracelluláris térben ellátó fehérjék, így a lizil-oxidázok (LOX, LOXL)¹⁶ vagy a gamma-glutamil-transzferázok (GGT)¹⁷ a sejtmembránon kívül megjelenő ROS enzimatikus forrásaiként szolgálhatnak. Fontos hangsúlyozni, hogy az eddig említett enzimreakciók során az oxigénszármazékok melléktermékként keletkeznek. A célzott ROS termelés jelenlegi tudásunk szerint a NADPH-oxidáz (Nox/Duox) enzimek sajátossága, melyek működése azonban jellegzetes szöveti expressziójuk következtében nem tekinthető a sejtekre általánosan jellemző ROS-metabolizmus részének.⁹

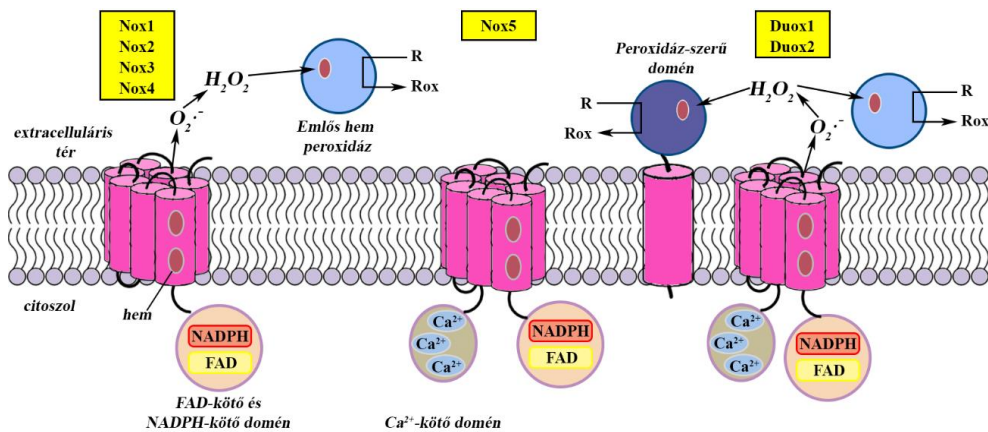
A ROS molekulák semlegesítésére a legtöbb emlős sejtben széleskörű antioxidáns védelem áll rendelkezésre, mely részben enzimatikus reakciókon, részben kisméretű antioxidáns molekulák jelenlétén alapul. A különböző forrásokból származó $\text{O}_2^{\cdot-}$ -ot az eltérő sejtorganellekben vagy extracellulárisan lokalizálódó SOD izoenzimek H_2O_2 -

dá és vízzé alakítják, de más fehérjék, így például a mitokondriális citokróm-oxidázok is hozzájárulhatnak a sejtekben keletkező $O_2^{\cdot-}$ semlegesítéséhez. A SOD1 a citoplazmában, a SOD2 a mitokondriumban, a SOD3 pedig az extracelluláris térben található. A SOD2 működése esszenciális az élethez, a SOD1 és SOD3 hiányához azonban csak enyhébb kórélettani eltérések társulnak.¹⁸ A keletkező H_2O_2 -ot a peroxiszómában, mitokondriális mátrixban és citoszolban található kataláz enzimek vízzé és O_2 -né alakítják (2.E ábra).¹⁹ A H_2O_2 eliminációjában a peroxiredoxinok (tioredoxin-peroxidázok) és a glutation-peroxidázok is részt vesznek, melyek redukált tioredoxin és glutation oxidációjához kapcsolt folyamatban bontják el a H_2O_2 -ot.^{14,20} A többnyire sejt- vagy szövetspecifikusan megjelenő hem-peroxidáz enzimek katalitikus működésük során szubsztrátjaik oxidációját H_2O_2 felhasználásával végzik, ezek a reakciók azonban nem képezik részét a sejtekre általánosan jellemző ROS-eliminációs útvonalaknak.^{21,22} Sokáig az a nézet uralkodott, hogy az említett antioxidáns enzimek pusztán a sejtekben keletkező ROS eltakarítóiként funkcionálnak, azonban egyre több adat támasztja alá az élettani szempontból legalább ennyire jelentős ROS-szenzor funkciójukat, amelynek molekuláris alapját az egyes oxigénszármazékok irányában mutatott nagy affinitásuk és specificitásuk szolgáltatja.^{23,24} Az enzimatis ROS-elimináló mechanizmusok mellett számos kisméretű antioxidáns molekula is hozzájárul a sejtek redox homeosztázisának fenntartásához. Az apoláros jellegű tokoferol és ubikinon elsősorban a biológiai membránok antioxidáns védelmében játszanak szerepet. A vízóldékony molekulák közül az aszkorbát és a glutation (GSH) bír kiemelt jelentőséggel, melyek nagy koncentrációban jelennek meg a legtöbb sejtalkotóban.²⁵

3.1.3. A NADPH-oxidázok családja

A fagociták NADPH-oxidáz enzimkomplexének szuperoxid-termelése volt az elsőként megismert szabályozott ROS-termelő folyamat, később azonban több más sejtben és szövetben is igazoltak hasonló, enzimatis úton megvalósuló ROS-produkciót. A teljes humán genom szekvenciájának megismerése tette lehetővé a fagocita-oxidáz homológjainak, a NADPH-oxidáz (Nox/Duox) enzimes család tagjainak azonosítását,^{9,26-28} melyek egyes élettani funkcióikat peroxidáz enzimekkel kialakított együttműködésben látják el.

A fagocita-oxidáz (Nox2, korábbi nevén gp91^{phox}) mai tudásunk szerint 6 homológja létezik, amelyek 3 alcsaládba sorolhatóak szerkezeti jellegzetességeik és evolúciós eredetük alapján. Az első alcsaládot a Nox1, Nox2, Nox3 és Nox4 fehérjék alkotják, a második alcsaládba Duox1 és Duox2 tartoznak, végül pedig külön alcsoportba soroljuk a Nox2 legtávolabbi rokonát, a Nox5-öt. Mindegyik Nox/Duox enzim működésére jellemző, hogy az intracelluláris térben lévő nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátról (NADPH) elektronokat transzportálnak egy flavin-adenin-dinukleotid (FAD) koenzimen és az enzim transzmembrán (TM) régiójában kötött két hem csoporton keresztül a membrán másik oldalára, ahol ezzel O₂-t redukálva O₂⁻-ot vagy H₂O₂-ot képeznek. A Nox5 és Duox fehérjék intracelluláris szakaszukon Ca²⁺ kötésére képes EF-kéz motívumokat is tartalmaznak, a Duox enzimeknek pedig részét képezi egy további, extracellulárisan elhelyezkedő peroxidáz-homológ régió is (3. ábra).⁹ Az egyes enzimek esetében különböző további szabályozófehérjék szükségesek a ROS előállítására képes komplex kialakításához.⁹ Utóbbiak közé tartozik a p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, GTP-kötött Rac, NoxO1 (NADPH-oxidáz szabályozó 1), NoxA1 (NADPH-oxidáz aktivátor 1), DuoxA1 (kettős oxidáz aktivátor 1) és DuoxA2 (kettős oxidáz aktivátor 2).



3. ábra: A Nox/Duox enzimes család tagjainak szerkezete (⁹ alapján). Az ábrán a funkcióképes oxidázkomplexek kialakításában közreműködő fehérjepartnerek nem kerültek feltüntetésre.

A Nox és Duox enzimek jellegzetes expressziós mintázatot mutatnak.²⁶ A Nox1 legnagyobb mennyiségben a vastagbél nyálkahártyájában fejeződik ki, ahol vélhetően antimikrobiális funkciót lát el, az érrendszerben expresszálandó Nox1 pedig a vazoregulációban bírhat jelentőséggel. A Nox2 részvételével képzett enzimkomplex

felelős a professzionális fagocitákban megfigyelhető oxidatív robbanásáért, ami hozzájárul a patogén mikroorganizmusok elpusztításához. A Nox3-at elsőként főtális szövetekben mutatták ki, később azonban kiderült, hogy a fehérje elengedhetetlen a belső fül otolitikristályainak kialakulásához is. A Nox4 elsődlegesen a vesében és az érrendszerben expresszálódik, az említett szövetekben betöltött funkciójával kapcsolatos számos elképzelés közül ezidáig azonban egyiket sem sikerült meggyőzően igazolni. A Duox1 és Duox2 enzimek eltérő mértékben fejeződnek ki a pajzsmirigyben, a gasztrointesztinális és a légzőrendszeri epitéliumban, valamint a nyálmirigyekben. A Duox2 működése esszenciális a pajzsmirigyhormonok szintéziséhez, emellett a Duox enzimeknek a nyálkahártyafelszínnek védelmében is jelentőséget tulajdonítanak. A Nox5 a herében, illetve egyes limfoid szövetekben fejeződik ki nagyobb mennyiségben, élettani szerepével kapcsolatban azonban még kevés információval rendelkezünk.^{26,29}

3.1.4. Peroxidáz enzimek

A H_2O_2 a többi ROS molekulával összehasonlítva is kiemelten fontos élettani szerepet tölt be. Ennek háttérében egyrészt az a megfigyelés áll, hogy az intracellulárisan megjelenő H_2O_2 egyes jelátviteli útvonalak szereplőit ciszteinjeik reverzibilis oxidációján keresztül módosítja, így közvetlenül képes befolyásolni az adott szignalizációs pályát. Habár a H_2O_2 direkt interakciói igen nagy jelentőséggel bírnak a sejtműködés szabályozásában, a molekula legismertebb hatásait peroxidáz enzimek közvetítik.

Peroxidázaktivitású fehérjék az élővilág minden szerveződési szintjén megjelennek, azonban ezek a fehérjék a H_2O_2 szubsztrátként való felhasználására vonatkozó képességükön túl igen heterogén csoportot alkotnak. Legegyszerűbb csoportosításukat a hemkötő és hemet nem tartalmazó peroxidáz enzimek elkülönítése jelenti.³⁰ Az utóbbi csoport képviselőinek katalitikus aktivitását egy, az aktív centrumban elhelyezkedő redoxérzékeny aminosav, így a peroxiredoxinok és a csoport legtöbb más képviselője esetében egy cisztein, a glutation-peroxidáz szekvenciájában pedig egy különleges szelenocisztein reziduum jelenléte biztosítja.^{31,32}

A hemtartalmú peroxidáz enzimek hisztidin vagy cisztein oldalláncon keresztül rögzített hem b-t vagy kovalensen kötött, posztisztetikusan módosított hemet tartalmaznak, aminek segítségével változatos szubsztrátok egy- és kételektronos

oxidációs folyamatait katalizálják. Ezeket az enzimeket klasszikusan két nagy csoportba szokás osztani, az állati hem-peroxidázok családjára és a prokarióta eredetű, a szekretálódó gomba és a szekretálódó növényi peroxidázok osztályát magában foglaló családra.^{21,33} A különbségtételt az élővilág eltérő országaiban jellemző megjelenés mellett az ismert peroxidáz fehérjék szerkezetvizsgálata és szekvenciaanalízise során kapott eredmények is indokolták, amelyek arra utalnak, hogy a két enzimes család eltérő eredettel bír és a kémiai jellegzetességeik között kialakult hasonlóság konvergens evolúciós fejlődés eredménye. A közelmúltban több szekvenciát tartalmazó adatbázis fejlettebb szoftverekkel végzett analízise alapján négy, egymástól független fejlődési útvonalat írtak le a hem-peroxidázok szupercsaládjában, melyeknek tagjai másodlagos szerkezetükben és aktív helyük kialakításában is különbségeket mutatnak egymáshoz képest.³⁴ Ezek az eltérések funkcionális jelentőséggel is bírnak, amennyiben az egyes alcsoportok a peroxidázaktivitás mellett vagy ahelyett megjelenő, alternatív katalitikus aktivitással is rendelkeznek. A klasszikusan állati hem-peroxidázként azonosított molekulák a peroxidáz-ciklooxygenáz csoport tagjait képezik, amíg a bakteriális, gomba és növényi hem-peroxidázokként klasszifikált enzimek többsége az új felosztás szerint a peroxidáz-kataláz családba tartozik. Emellett azonosítottak egy, a peroxidázaktivitáson kívül klorit-dizmutáz és egy másik, peroxigenáz aktivitással jellemezhető csoportot is.³⁴ A családok tagjai ubikviter módon jelennek meg az élővilág összes országának egyes képviselőiben, ami alátámasztja az inkább enzimatikus jellemzők, mint az expressziós mintázat figyelembevételével történő csoportosítás létjogosultságát. Munkacsoportunk érdeklődésének megfelelően a továbbiakban az emlősökben is kifejeződő állati hem-peroxidázok jellemzőinek ismertetésére szorítkozom.

3.2. Az emlős hem-peroxidázok családja

Az állati hem-peroxidázok elsőként emlősökben azonosított, klasszikusan ismert képviselői a mieloperoxidáz (MPO), eozinofil peroxidáz (EPX), laktoperoxidáz (LPO) és tireoperoxidáz (TPO), valamint a külön alcsoportot képező ciklooxygenáz 1 és 2 enzimek (COX1, COX2). A fehérjecsalád legújabbán megismert két tagjáról, a peroxidazinról (PXDN) és a peroxidazin-szerű fehérjéről (PXDNL) rendelkezésre álló irodalmi háttér áttekintése előtt az állati hem-peroxidázok általános jellemzőit, majd az enzimes család

egyres tagjainak szerkezeti és katalitikus tulajdonságait mutatom be, amelyek segítségünkre voltak a PXDN struktúra-funkció vizsgálata során végzett kísérleteink tervezésében. Végül röviden kitérek a NADPH-oxidáz és hem-peroxidáz enzimek között több szövet- és sejtféleségben is megjelenő kooperációra, ami a PXDN-nel együttműködő, ezidáig ismeretlen ROS-forrás azonosításához jelenthet kiindulópontot.

3.2.1. Az állati hem-peroxidázok általános jellemzői

Bár az állati hem-peroxidázok enzimaktivitásuk és az azt lehetővé tevő szerkezeti jellemzők tekintetében igen hasonlóak egymáshoz, szekvenciájuk további jellegzetességei és eltérő expressziós mintázatuk nagy funkcionális diverzitást kölcsönöz a csoport képviselőinek. Elsőként az enzimsalád minden tagjában azonos, katalitikus aktivitást biztosító szerkezeti elemeket és a hem-peroxidázok működésére jellemző redox ciklus állomásait mutatom be.

3.2.1.1. Az állati hem-peroxidázok szerkezete

A klasszikusan állati hem-peroxidázokként kategorizált fehérjék a peroxidáz-ciklooxigenáz enzimsaládba tartoznak. A csoport képviselőinek katalitikus aktivitásához elengedhetetlen proszterikus csoport egy ferri-protoporfirin IX származék, ami a peroxidáz doménon belüli 5 α -hélix által kialakított szerkezeti magban helyezkedik el, és kovalens kötések keresztül kapcsolódik a polipeptidlánchoz.²¹

Az MPO és az EPX, valamint az LPO filogenetikailag közel állnak egymáshoz, és a fehérjéket kódoló gének egymáshoz igen közeli helyzete is arra utal, hogy azok egy közös ősi génből génduplikációval jöhettek létre. A TPO és a PXDN, valamint a PXDNL evolúciós szempontból távolabb helyezkednek el a három említett fehérjétől, amit a peroxidáz domén primer szekvenciájában tapasztalt eltéréseken túl további strukturális motívumok megjelenése is alátámaszt.³⁵ A COX1 és COX2 enzimek mind szerkezeti, mind funkcionális szempontból külön alcsoportot képeznek.³⁶ A család minden egyes tagja számos poszttranszlációs módosításon megy keresztül. A végleges szerkezet kialakítása során több esetben limitált proteolízissel módosul a fehérjelánc, emellett N-glikozilációval cukorcsoportok is kapcsolódnak a molekulákhoz.

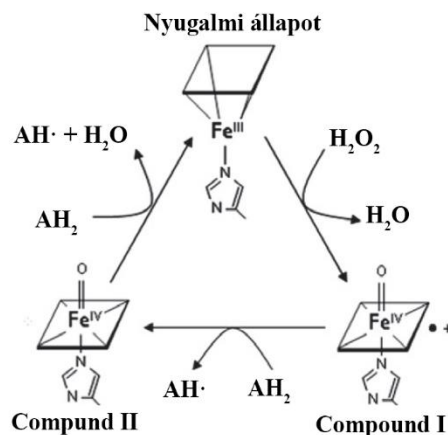
A peroxidázaktivitás szempontjából elengedhetetlen a hem prosztetikus csoport stabil és koordinált kapcsolódása a fehérjelánchoz, amit több erősen konzervált aminosav együttműködése tesz lehetővé. A hem b kovalens észterkötéssel kapcsolódik két meghatározott pozícióban található aszpartát és glutamát (az MPO esetében pedig egy további metionin) reziduumhoz, ami megtöri a prosztetikus csoport lapszerű jellegét és szimmetriáját.³⁷ Nyugalmi állapotban a hem egy ötszörösen koordinált Fe^{3+} -t tartalmaz, melynek axiális koordinációs pozícióját egy proximálisan elhelyezkedő konzervált hisztidin imidazol gyűrűjének ϵ -nitrogén atomja foglalja el, amíg ugyanezen hisztidin δ -nitrogénje hidrogénhídon keresztül kapcsolódik egy szintén konzervált helyzetű aszparagin aminosavhoz. A hem pozicionálásában egy másik, disztális helyzetű aminosavcsoport is szerepet játszik. Az itt található glutamin reziduum egy közeli hisztidinnel, valamint egy, a primer szekvenciában távolabb eső argininnal alakít ki hidrogénhidakat, amivel a halid szubsztrátok pozicionálásához járul hozzá.³⁸⁻⁴⁰

3.2.1.2. Az állati hem-peroxidázok katalitikus ciklusa

Az állati hem-peroxidázok számos eltérő kémiai jellegű szubsztráttal képesek reakcióba lépni, azonban azok irányában eltérő specificitást és reakciókészséget mutatnak. Az élő szervezetben megvalósuló folyamatokat ezen felül a szubsztrátok *in vivo* elérhetősége is befolyásolja, ami a jellegzetes expressziós mintázattal jellemezhető hem-peroxidáz enzimek esetében meghatározó tényező. A hem-peroxidázok ezen különbségek ellenére is azonos katalitikus ciklus mentén működnek, ami három egymást követő redox lépésen alapul (4. ábra). Elsőként az enzim két elektronátmenettel járó oxidoredukciós lépésben reagál a H_2O_2 -dal, melynek során az vízzé redukálódik, az enzim pedig ún. compound I formájába kerül. A compound I centrumában található vas oxiferril (Fe(IV)=O) formává oxidálódik, emellett pedig egy porfirin-p szerves kation gyök is kialakul a hem csoporton. A compound I és II közötti átmenet során az említett kationgyök egy elektronátmenettel zajló lépésben redukálódik, amivel párhuzamosan egy szubsztrátmolekula oxidációja is végbemegy. A compound II forma oxiferril centruma egy második szubsztrátmolekula oxidációja során redukálódik a nyugalmi állapotra jellemző ferri-formába, ami egyben a folyamat sebességmeghatározó lépését is jelenti. A hem-peroxidázokra igen jellemző halogenizációs ciklusban a compound I egylépésben,

két elektronátmenettel járó folyamatban redukálódik vissza a ferri vasat tartalmazó formává, miközben a reakcióban résztvevő halid- és pszeudohalid-ionok a megfelelő hipohalidos- vagy pszeudohipohalidos-savvá alakulnak. Az evolúciósan konzervált disztális hisztidin és arginin aminosavmaradékok fontos szerepet játszanak a compound I és II kialakításában és stabilizálásában.^{21,41}

Az oxidoredukciós átmenetekben szereplő három redoxpár, így az $\text{Fe}^{3+}/\text{compound I}$, a $\text{compound I}/\text{compound II}$ és a $\text{compound II}/\text{Fe}^{3+}$ redoxpotenciáljainak viszonya jelentősen mértékben meghatározza a peroxidáz ciklus kinetikáját. Feltételezhető, hogy a különböző peroxidázokat jellemző termodinamikai eltérések az enzimműködés követelményeihez igazodnak, ezáltal nagyobb szubsztrátspecifitást és hatékonyabb elektrontranszfert tesznek lehetővé. Annak ellenére, hogy a két forma közötti átalakulás nem képezi annak részét, *in vivo* körülmények között a $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ pár redoxpotenciálja is indirekten befolyásolhatja a katalitikus ciklus lépéseit.⁴¹



4. ábra: A hem-peroxidázok katalitikus ciklusa (²¹ módosításával). A H_2O_2 redukciója során az enzim hem proszitetikus csoportján egy oxiferril-csoport és egy porfirin-p szerves kationgyök alakul ki, ami a fehérje compound I formájának felel meg. A peroxidáz a szubsztrátmolekulák oxidációja során két lépésben, egy köztes, compound II formán keresztüli átmenettel alakul vissza nyugalmi állapotába.

A peroxidáz ciklus átmenetei során az enzim számos különböző szerves és szervetlen ion és molekula oxidációját katalizálhatja. Az állati hem-peroxidázok élettani szempontból leglényegesebb szubsztrátjai a halid- és pszeudohalid-ionok, valamint egyes aminosavak, így többek között a tirozinok oldalláncai, de ezek az enzimek más kisméretű ionokkal, így például nitrittel, vagy egyéb fenol-, indol-, vagy aromás amincsoportokat tartalmazó molekulákkal is könnyen reakcióba léphetnek. A kereskedelmi forgalomban

számos, a peroxidázaktivitás hatékony detektálására kifejlesztett mesterséges szubsztrát is elérhető, melyek eltérő kémiai jellege az egyes peroxidáz enzimek esetében más-más szenzitivitású reakciót eredményezhet. Ilyen vegyület többek között az Amplex Red peroxidáz szubsztrát, a TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin), a DAB (3, 3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid), az o-dianizidin és a luminol.

3.2.1.3. Az emlős hem-peroxidázok működésének élettani jelentősége

Az alacsonyabbrendű élőlényekben már sok esetben részletesen feltérképezett, peroxidáz-mediált folyamatok mellett emlősökben is egyre több fiziológiás működésben igazolódik az hem-peroxidázok által katalizált reakciók jelentősége. Az enzimesalád régóta ismert tagjai jellegzetes, egy-egy sejt- vagy szövetféleségre korlátozódó expressziós mintázatot mutatnak, aminek megfelelően az enzimaktivitásukhoz köthető élettani funkciók is igen specifikusak. Az MPO, EPX és LPO egyaránt a természetes immunrendszer részét képezik, azonban a szervezet különböző pontjain, eltérő jellegű behatolókkal szemben járulnak hozzá a természetes immunválaszhoz.²² A TPO a pajzsmirigyhormon-szintézis esszenciális résztvevője,⁴² amíg a COX1 a szövetek homeosztatisztikus, a COX2 pedig a gyulladás során indukált prosztanoidszintéziséért felelős.⁴³ A legújabban megismert PXDN általános szöveti előfordulásának és különleges doménszerkezetének köszönhetően vélhetően testszerte az extracelluláris mátrixok kialakításában vesz részt,⁴⁴ amíg szívspecifikus homológjáról, a PXDNL-ről egyelőre nem rendelkezünk funkcionális adattal. A következőkben az emlős hem-peroxidázok expressziós mintázatának, szerkezeti és katalitikus jellemzőinek részletes ismertetésével igyekszem megvilágítani az egyes enzimekhez kapcsolódó eltérő funkciók hátterét.

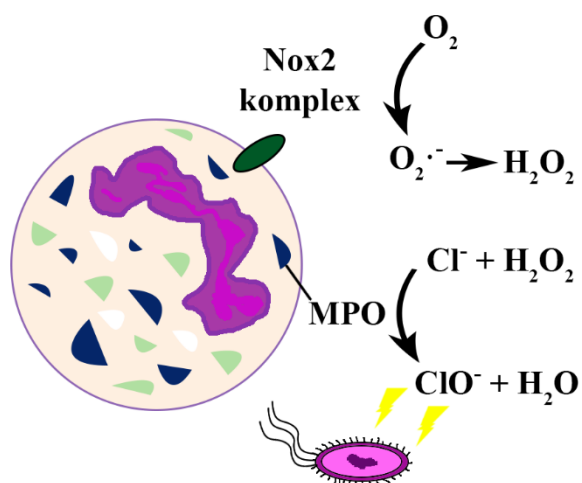
3.2.2. A mieloperoxidáz (MPO)

Az emlős hem-peroxidázok elsőként megismert képviselője, az MPO neutrofil granulocitákban és monocitákban, valamint a szövetekben található makrofágokban fejeződik ki. Emellett a keringésben is kimutatható az MPO egy részlegesen processzált formája, ami vélhetően a csontvelői mieloid előalakokból konstitutív szekréció útján kerül a vérplazmába.⁴⁵ Amíg a fagocita sejtekben tárolt MPO a természetes

immunrendszer részeként a bakteriális és gombás fertőzések leküzdésében játszik szerepet, a vérplazmában megjelenő forma élettani jelentősége egyelőre nem tisztázott.

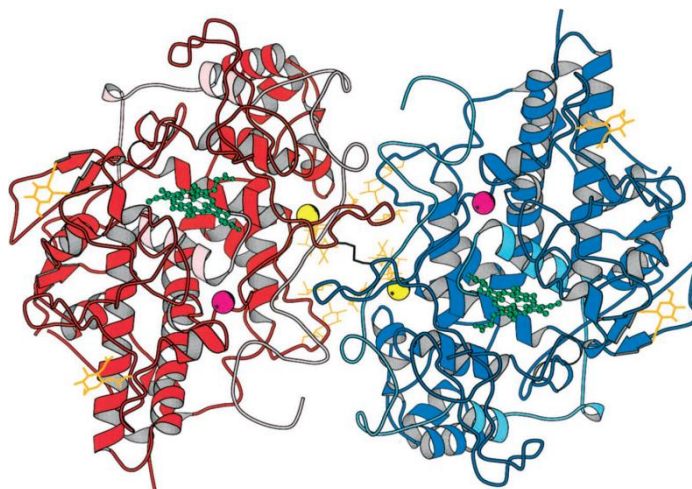
Az MPO több más antibakteriális hatású fehérjével és enzimmel együtt a fagocita sejtek azurofil granulumaiban tárolódik. A patogén mikroorganizmus bekebelezésével párhuzamosan indul meg a degranuláció folyamata, melynek során a különböző granulumok tartalma meghatározott sorrendet követve a fagoszóma terébe ürül. Az MPO közeli funkcionális kapcsolatban áll a fagocita sejtekre jellemző NADPH-oxidáz izoformával, a Nox2-vel, amely a sejt aktivációját követően az oxidáz komplex többi alegységével a fagoszóma membránjánál komplexet alkotva $O_2^{\cdot-}$ képződését katalizálja. A fagoszóma belső terében az MPO a $O_2^{\cdot-}$ -ből képződő H_2O_2 -ot felhasználva a legnagyobb mennyiségben elérhető halidion, a Cl^- oxidálásával hipoklórossavat (HOCl) képez. A savmaradék hipoklorit-anion (OCl^-) előalakjainál erősebb oxidálóképességgel rendelkező, agresszívebb intermedier, amely a bekebelezett mikroorganizmus sejt felszíni molekuláinak aspecifikus oxidációjával a membrán károsodását okozza, és ezáltal hozzájárul a patogén elpusztításához (5. ábra).^{46,47}

Több különböző fajból származó MPO-nak is ismert a kristályszerkezete, ami az állati hem-peroxidázok enzimaktivitásához szükséges strukturális feltételek tanulmányozásának kiindulópontját jelentette.^{38,48} Az MPO mRNS-ről egy 745 aminosavból álló, 80 kDa-os polipeptidlánc transzlálódik, amelyből a szignál peptid lehasadását, valamint többszörös N-glikozilációs lépéseket követően a 90 kDa-os apoproMPO alakul ki. A fehérje a hem prosztetikus csoport kapcsolódásával alakul át proMPO-vá, majd több limitált proteolitikus lépésen is keresztül megy. A proMPO-ból az N-terminális propeptid és egy láncközi hexapeptid is kivaszál, aminek eredményeképpen egy 12 kDa-os könnyű és egy 60 kDa-os nehéz láncból felépülő MPO



5. ábra: A mieloperoxidáz (MPO) működése. A professzionális fagocitákban kifejeződő MPO a Nox2 enzimkomplex által termelt ROS-t felhasználva OCl^- -ot állít elő, ami hozzájárul a kórokozók elpusztításához.

protomer keletkezik. Két ilyen alegység diszulfidhíddal összekötött, szimmetrikus kombinációja adja az érett MPO-ra jellemző dimer formát (6. ábra).^{38,45,49} Az azurofil granulumokban tárolt, teljes érési folyamaton átesett fehérjével szemben a keringésben konstitutív szekréció eredményeképpen megjelenő forma a monomer proMPO erősen glikozilált változatának felel meg. A dimerizáció funkcionális jelentőségéről egyelőre keveset tudunk, de *in vitro* mérések során a rekombináns proMPO a dimerizálódott fehérjével azonos peroxidázaktivitást mutatott, így feltételezhető, hogy a két forma *in vivo* körülmények között is hasonló katalitikus jellemzőkkel rendelkezik.⁵⁰



6. ábra: Az MPO által alkotott homodimer szerkezete.³⁸ A dimert felépítő két alegységet kék és piros szín jelzi, a nehéz lánc sötétebb, a könnyű pedig világosabb árnyalatban van feltüntetve. A két molekulát összekötő, Cys319-ek között kialakuló intermolekuláris diszulfidhíd fekete színben jelenik meg a szerkezeti ábrán.

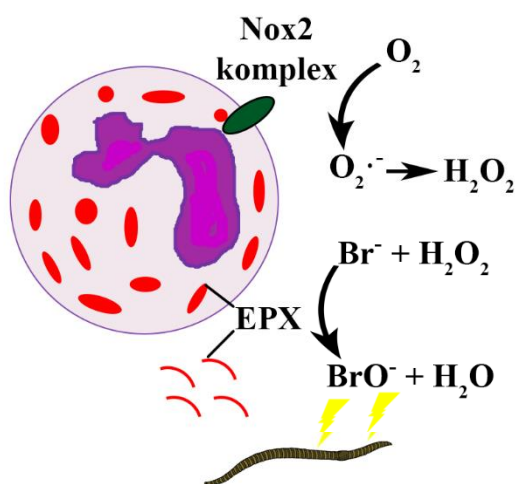
Az MPO szekvenciában összesen 15 cisztein található, melyek hat igazolt intramolekuláris diszulfidhíd képzésével szilárdítják meg a fehérje harmadlagos szerkezetét. Az MPO dimerizációjáért felelős, 319. pozíciójú cisztein vélhetően a propeptid levágódása során szabadul fel egy, a leváló régióban található ciszteinnel kialakított instabil diszulfidkötésből, hogy aztán a lehasadt peptidszakasz tiol-izomeráz működésének segítségével a szimmetrikus MPO dimer kialakításához járuljon hozzá.^{38,51}

Az MPO genetikai eredetű hiánya nem jár klinikai tünetekkel, azonban az érintett betegek fogékonyabbak a szisztémás kandidiázis kialakulására.⁵² Számos kardiovaszkuláris kórkép, többek között a szívelégtelenség, hipertónia, egyes gyulladásoz érbetegségek és az ateroszklerózis patomechanizmusában is felvetették az MPO közreműködését, ami jelenleg az enzimmel kapcsolatos kutatások legforróbb területét

jelenti.^{53,54} Bizonyítást nyert, hogy az ateroszklerotikus elváltozásban található habos sejtek lokálisan megjelenő citokinszignálok hatására proMPO-t szintetizálhatnak, amely szekrécióját követően az ateróma extracelluláris terébe jutva az ott található fehérjéket és lipoproteineket oxidálja. Az MPO által kialakított oxigéntartalmú intermedierek az érintett szövetek makromolekuláinak aspecifikus módosításával a kardiomiociták és az endotélsejtek diszfunkciójához is hozzájárulnak.⁴⁵

3.2.3. Az eozinofil peroxidáz (EPX)

1Az EPX az eozinofil granulocitákban fejeződik ki, és a bennük tárolt további, erősen kationos fehérjékkel együtt elsősorban a parazitafertőzések leküzdésében bír jelentőséggel. A nagyméretű protozoonok és férgek esetében a professzionális fagociták elsősorban intracelluláris ölési mechanizmusai hatástalanok, ezért a fertőzéssel szembeni effektív fellépés az eozinofil granulociták degranulációját követően a sejten kívüli térbe ürített toxikus fehérjék segítségével valósul meg. Az EPX a parazita felszínén elhelyezkedő makromolekulák károsításával járul hozzá az állat pusztulásához, amihez a Nox2 NADPH-oxidáz izoforma részvételével képzett oxidázkomplex biztosítja az oxigéntartalmú intermediereket (7. ábra). Az EPX jelentősége immunvédelmi funkciója mellett egyes allergiás kórképek, többek között az allergiás rinitisz és az asztma



7. ábra: Az eozinofil peroxidáz (EPX) működése. Az eozinofil granulociták Nox2 enzimkomplexe által termelt ROS részben direkt módon, részben az EPX által kialakított hipohalit formájában károsítja a szervezetet megtámadó parazitákat.

patomechanizmusában is igazolódott, hiánya azonban nem okoz klinikai tüneteket.^{55,56}

Az EPX mRNS transzlációja során szintetizálódó, 715 aminosavból álló preproprotein az MPO esetében tárgyalthoz hasonló glikozilációs és fehérjehasítással járó érési lépéseken megy keresztül, aminek eredményeképpen egy könnyű és egy nehéz lánc kombinációjából felépülő szerkezet alakul ki. Az EPX további szerveződésével kapcsolatban

ellentmondásosak a források, egyes szerzők monomerként, mások viszont dimerként említik a molekulát. Az EPX kristálystruktúrája egyelőre nem ismert, így az esetleges dimerizáció mechanizmusára csak az MPO és az LPO szekvenciájával és éréseivel mutatott hasonlóságokból kiindulva következtethetünk.⁵⁷ Az EPX enzimreakcióiban többféle halidot is felhasználhat, többek között a Br⁻-ot is hatékonyan tudja oxidálni. Ennek a megfigyelésnek az *in vivo* jelentősége egyelőre kérdéses.^{58,59}

3.2.4. A laktoperoxidáz (LPO)

Az LPO exokrin mirigyek által termelt szekréciós fehérjetermék, amely nagy koncentrációban jelenik meg bizonyos nyálkahártyafelszíneken, ahol azok természetes immunvédelméhez járul hozzá. A fehérje magas expressziót mutat a nyál- és könnymirigyekben, a laktáló emlőmirigyekben, valamint a nagy légutak hámjának mirigyeiben. Az LPO leghatékonyabban tiocianát (SCN⁻)-ionokat használ fel katalitikus működéséhez, amely a nyálban, könnyben, anyatejben és a légutakat fedő folyadékfilmben egyaránt nagy mennyiségben van jelen.^{60,61} Az adott szervben kifejeződő Duox izoforma, vagy éppen a bekerülő patogének biztosítják a H₂O₂-ot a peroxidáz reakcióhoz, melynek során hipotiocianát (OSCN⁻) keletkezik (8. ábra). A OSCN⁻ kevésbé agresszív oxidálószer, mint a H₂O₂ egyéb halidokkal képzett termékei, ami a nyálkahártyák LPO-működéshez kapcsolódó oxidatív károsodásának valószínűségét jelentősen csökkenti.

Az LPO 712 aminosavból álló polipeptidként szintetizálódik, majd az MPO-hoz és EPX-hez hasonlóan több pozícióban glikozilálódik és egy N-terminális propeptid is lehasad a fehérjéből. Több különböző faj LPO fehérjéjének is ismert a kristályszerkezete, a humán LPO azonban nem tartozik ezek közé.^{40,62,63} A hem-peroxidázok szekvenciájában konzervált 14 cisztein reziduum mellett a vizsgált fajokból származó LPO fehérjék egy, a humán LPO pedig két további ciszteint is tartalmaz.⁵⁷ Ezek térben vélhetően igen távol esnek egymástól, így valószínűtlen, hogy közreműködésükkel egy újabb intramolekuláris diszulfidhíd alakulna ki a fehérjében. A propeptid lehasítása az LPO esetében az MPO-nál tapasztalttól kissé eltérő pozícióban megy végbe, aminek eredményeképpen az utóbbi dimerizációjáért felelős cisztein megfelelője az érett LPO-ban intramolekuláris diszulfidkötésben marad N-terminálisan megtartott partnerével.⁵⁷

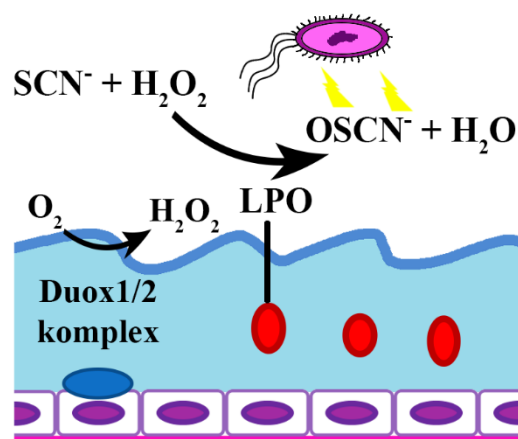
Ez lehet a magyarázata annak, hogy az érett LPO nem képez diszulfidhíddal stabilizált dimer szerkezetet, azonban saját peroxidázaktivitása segítségével két fehérjelánc 289. pozíciójában található tirozin aminosavai között ditirozinkötést hozhat létre, így az endogén enzimaktivitástól függő módon alakulhat ki dimer formájú LPO.^{50,64}

Az LPO által termelt oxidánsok jelentőségét a nyálkahártyák antibakteriális védelme mellett más folyamatokban is felvetették. Az

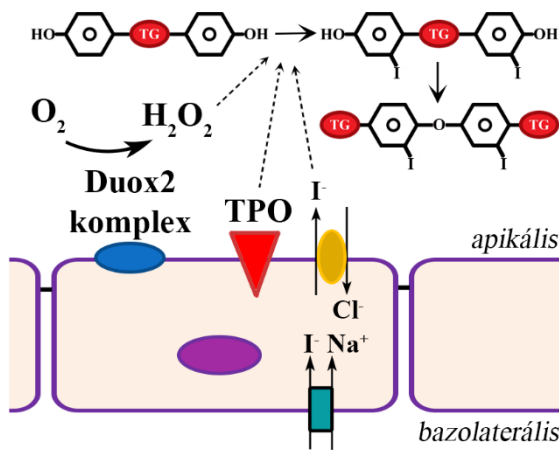
anyatejben nagy mennyiségben megjelenő LPO a szoptatás ideje alatt az utód immunvédelméhez járulhat hozzá a szájüregben és a gastrointesztinális rendszer kezdeti szakaszain.⁶⁵ Szintén felmerült, hogy a szervezetben a OSCN^- mennyiségének módosításával lehetne befolyásolni a nyálkahártyák oxidatív státuszát.⁶⁶ Érdekes megfigyelés, hogy bizonyos diéták mellett a dohányzás is igen jelentősen megnöveli a szérum SCN^- szintjét, ami hozzájárulhat egyes gyulladásos kórképek kialakulásának nagyobb valószínűségéhez.⁶⁷

3.2.5. A tireoperoxidáz (TPO)

A pajzsmirigy-specifikus expressziót mutató TPO esszenciális szerepet tölt be a tiroxin (T_4) és a trijód-tironin (T_3) hormonok szintézisében. A 933 aminosavból álló fehérje az enzimesalád többi tagjától eltérően egy transzmembrán régiót is tartalmaz, ami egy hosszú, a katalitikus domént is magába foglaló extracelluláris szakaszt választ el a polipeptidlánc rövid intracelluláris szegmensétől.⁶⁸ A fehérje a tireociták apikális membránjában helyezkedik el, ahol a Doux2-DuoxA2 komplex által előállított H_2O_2 -ot a follikuláris lumenben található tireoglobulin (TG) tirozin oldalláncainak jódozására használja fel. A TPO a tireociták által felvett I^- ionokat a katalitikus reakció során jódatomokká oxidálja, amelyek nagy reakciókészségüknek köszönhetően könnyen



8. ábra: A laktoperoxidáz (LPO) működése. A szekretált LPO a Duox enzimkomplex által termelt H_2O_2 -ot OSCN^- előállításán keresztül a nyálkahártyafelszínnek védelmére használja fel.



9. ábra: A tireoperoxidáz (TPO) működése. A TPO a pajzsmirigyhormonok szintézise során a Duox2 enzimkomplex által előállított H_2O_2 -ot felhasználva a tireoglobulin (TG) tirozin oldalláncainak jódozását és ditirozinhidakon keresztüli összekapcsolását katalizálja.

szubsztituálják a tirozin oldalláncok fenol csoportjának 3-as és az 5-ös pozíciójú szénatomjaihoz kapcsolódó hidrogénatomot. Ezt követően az enzim két, már szubsztituált tirozin oldalláncának kondenzációs reakcióban végbemenő kovalens összekapcsolását katalizálja, aminek eredményeképpen a tireoglobulinhoz kötött formában alakulnak ki a T_4 és a T_3 molekulák (9. ábra).⁶⁹ A TPO pajzsmirigyhormonszintézisben betöltött esszenciális szerepét igazolja, hogy az enzim genetikai eredetű hiánya hipotireózis

kialakulásához vezet.^{70,71} Emellett a Hashimoto-tireoiditisz nevű kórképben több más autoantitest mellett TPO-ra specifikus ellenanyagok is megjelennek az érintett betegek szervezetében, amelyek a kórállapot kifejlődésében játszott szerepük mellett a betegség diagnózisának felállításához is támpontként szolgálhatnak.⁷²

3.2.6. A ciklooxygenáz 1 és 2 (COX1 és COX2)

A COX1 és COX2, vagy más néven prosztaglandin H-szintáz 1 és 2 szerkezetét és működését tekintve is a leginkább eltérő az emlős hem-peroxidázok családjában. A közelmúltban egy újabb, a COX1 mRNS-ből alternatív splicinggal kialakuló hosszabb, COX3-nak nevezett izoformát is azonosítottak kutya agyszövetből,⁷³ aminek humán megfelelőjével kapcsolatban egyelőre sok a bizonytalanság. A COX1 és COX2 aminosavsorrendje egymáshoz jelentősen, a többi hem-peroxidázhoz viszont jóval kevésbé hasonlít, ami alapján úgy gondoljuk, hogy a hasonló katalitikus funkcióknak egyes reziduumok konzerváltsága mellett inkább a kristályszerkezet, mint a szekvenciabeli hasonlóság képezi az alapját.⁷⁴ Mindkét fehérje a prosztanoidok bioszintézisében játszik szerepet, de amíg a COX1 ubikviter előfordulást mutat és konstitutív aktivitásával a szövetek homeosztázisának fenntartásához szükséges arachidonsav-származékok

szintézisében vesz részt, addig a COX2 nyugalmi körülmények között igen alacsony mértékben fejeződik ki az egyes sejttípusokban. Bizonyos proinflammatorikus szignálok hatására azonban a COX2 gyorsan indukálódhat az érintett szövetekben, ami a gyulladáshoz vezető mediátorokként is ismert prosztanoidok lokálisan megnövekedett mértékű szintéziséhez vezet.⁷⁵

A COX enzimek membránkötött, multidomén fehérjék, amelyek az endoplazmás retikulumban helyezkednek el és homodimer formában funkcionálnak.⁷⁴ A COX enzimek egyidejűleg rendelkeznek peroxidáz- és ciklooxygenáz-aktivitással, melyekért a C-terminálisan elhelyezkedő globuláris domén eltérő régiói felelősek. A prosztanoidok szintézise során a ciklooxygenáz-aktivitás az arachidonsav és a prosztaglandin G2 közötti átalakuláshoz szükséges, az így nyert terméket pedig az enzim endogén peroxidázaktivitása segítségével alakítja tovább prosztaglandin H₂-vé.⁷⁵ A gyógyászatban igen kiterjedten alkalmazott nem szteroid gyulladáscsökkentők többnyire a COX aktív helyéhez kapcsolódva gátolják a gyulladáshoz vezető mediátorok szintézisét.

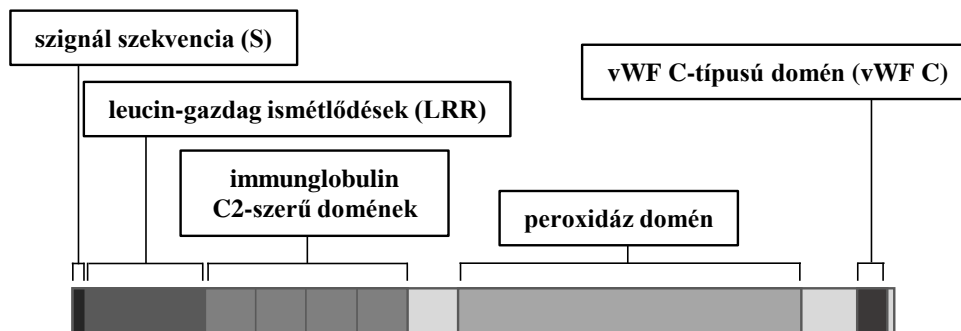
3.2.7. A peroxidazin (PXDN)

A PXDN az állati hem-peroxidázok családjának legújabbán megismert és ezidáig legkevésbé részletesen tanulmányozott tagja. A fehérjét elsőként *Drosophila melanogaster*-ben (ecetmuslicában) azonosították,⁷⁶ később azonban számos más állatfajban is fehérjeszinten igazolták a PXDN jelenlétét. A humán PXDN-t kezdetben tumoros sejtvonalakban, így például az EB1 vastagbélkarcinóma sejtvonalban vizsgálták,⁷⁷ később pedig melanómaasszociált fehérjeterméként írták le, ahonnan annak régi MG50 elnevezése is származik.^{78,79} Az EB1 sejtek p53-indukált apoptózisa során egy alternatív, rövid PXDN izoformát is kimutattak, aminek az élő szervezetben előforduló megfelelőjéről egyelőre nincsen adatunk.⁷⁷ A későbbi kísérleti eredmények a PXDN ubikviter előfordulását támasztották alá az emberi szervezetben.⁸⁰ Egy, a humán PXDN vizsgálatával foglalkozó munkacsoport annak kardiovaszkuláris rendszerben mutatott magas expressziója miatt közleményeiben konzekvensen vaszkuláris peroxidáz 1-ként (VPO1) hivatkozik a fehérjére.⁸¹ Mivel sem a humán fehérje szöveti expressziós profilja, sem annak definitív érrendszerrel nem rendelkező, alacsonyabbrendű élőlényekben

igazolt szerepe nem támogatja az új elnevezés helytállóságát, a tudományos közösség nagy része a továbbiakban is peroxidazinként említi a fehérjét.

3.2.7.1. A PXDN szerkezete és sejtszintű lokalizációja

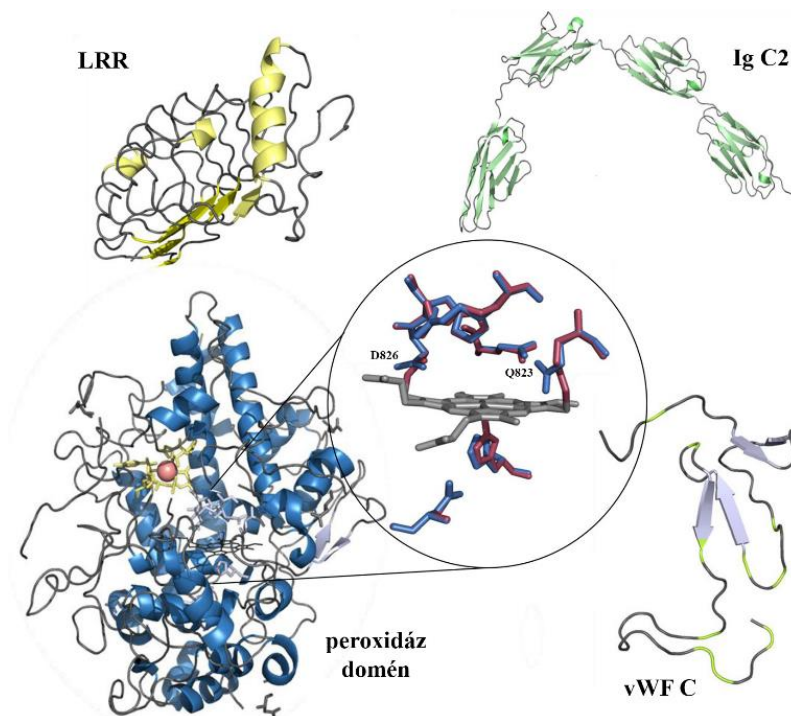
A PXDN különleges struktúrával bír, ugyanis a peroxidázaktivitásért felelős domén mellett más, az ECM-proteinekre jellemző szerkezeti elemek is megjelennek a fehérjében. A humán PXDN N-terminálisan egy szignál szekvenciát tartalmaz, amit hat leucin-gazdag ismétlődés (LRR), majd négy immunglobulin C2-szerű domén (Ig C2) követ, a fehérje C-terminálisán pedig egy α -helikális régió után egy von Willebrand faktor C-típusú domén (vWF C) helyezkedik el (10. ábra). Amíg a katalitikusan aktív peroxidáz domén változatos szubsztrátok oxidációjának katalízisére képes, a többi régió számos molekuláris interakció kialakítására teszi alkalmassá a fehérjét az extracelluláris térben. A PXDN kristályszerkezete egyelőre nem ismert, de az egyes domének háromdimenziós struktúrájáról már készültek spekulatív szerkezeti modellek (11. ábra).⁸²



10. ábra: A peroxidazin (PXDN) doménszerkezete

A PXDN egy ősi fehérje, amelynek különböző fajokban kifejeződő ortológjai nagymértékben konzervált szekvenciával és doménszerkezettel jellemezhetők.⁸³ A *Drosophila* fehérjét elsőként leíró munkacsoport kimutatta, hogy a PXDN homotrimer formában szekretálódik az extracelluláris térbe. A kovalensen keresztkötött trimer stabilizálásáért felelős aminosavakat, illetve az oligomerizáció pontos mechanizmusát a szerzők ugyan nem derítették fel, de a C-terminális vWF C domén, illetve az azt megelőző α -helikális régió részvételét feltételezték a negyedleges szerkezet stabilizálásában.^{82,84}

Az N-terminálisan megjelenő, extracelluláris térbe irányító szignál szekvencia, valamint a mátrixproteinekre jellemző domének jelenléte kezdettől azt valószínűsítette, hogy a PXDN elsődlegesen az ECM-be lokalizálódik, amit később számos vizsgálatban kísérletesen is alátámasztottak.^{44,76,81,85} Munkacsoportunk TGF β -val indukált humán pulmonális és dermális fibroblasztok extracelluláris terében detektált PXDN-tartalmú fibrillumokat.⁸⁰ A legtöbb vizsgált sejtes rendszerben a PXDN dominánsan megjelenik az endoplazmás retikulumban is, ennek funkcionális jelentősége azonban ezidáig nem tisztázódott.⁸⁰ A PXDN emellett szolubilis formában is kimutatható a rekombináns fehérjét expresszáló sejtek médiumában.⁸⁶



11. ábra: A PXDN doménjeinek spekulatív háromdimenziós modellje ^(82 módosításával). A leucin-gazdag ismétlődések (LRR), immunglobulin C2-szerű domének (Ig C2) és a von Willebrand faktor C-típusú domén (vWF C) az ECM fehérjéire jellemző motívumok. A PXDN peroxidáz doménjének modelljét annak LPO-val mutatott homológiája alapján állították fel. A peroxidázaktivitás szempontjából esszenciális konzervált glutamin (Q823) és aszpartát (D826) reziduum helyzete megtartott a PXDN hemkötő régiójában.

3.2.7.2. A PXDN enzimaktivitásának jellemzői

A PXDN peroxidáz doménje homológ a többi hem-peroxidáz fehérjével, és az összes olyan konzervált reziduumot tartalmazza, amely bizonyítottan szerepet játszik a hemkötésben és a peroxidáz enzimek katalitikus ciklusában.⁸³ A *Drosophila* és a humán

PXDN biokémiai jellemzőinek vizsgálta során több csoport is igazolta a fehérje halogenizációs és ditirozinképző aktivitását, valamint azok aziddal és phloroglucinollal (PhG) szemben mutatott érzékenységet. A PXDN számos mesterséges szubsztrát, többek között dianizidin és TMB oxidációját is képes katalizálni, hexadecil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB) detergens jelenlétében pedig megnövekedett peroxidázaktivitást mutat. Amíg a *Drosophila* PXDN-t a dianizidin, a humán fehérjét pedig a TMB oxidációja során a többi hem-peroxidázhoz viszonyítva jelentősen kisebb aktivitás jellemezte, előbbi a ditirozinképzésben a többi enzimnél hatékonyabbnak mutatkozott.^{76,81} A PXDN által katalizált, legújabban megismert reakcióforma a szulfiliminkötés-képzés, amit az enzim eddig ismert egyetlen fiziológiás szubsztrátjának, a kollagén IV-nek hipobromit (OBr⁻) felhasználásával történő oxidációja során mutattak ki.^{44,87}

3.2.7.3. A PXDN szerepe alacsonyabbrendű élőlényekben

A PXDN-t először *Drosophila melanogaster*ben azonosították, ahol az állat korai fejlődési stádiumaiban a fehérjét az ún. hemociták fejezik ki. A hemociták a behatoló mikroorganizmusok és apoptotikus testek eltávolítását végző, immunjellegű sejtek, melyek ECM komponensek, köztük kollagén IV és PXDN szekréciójával járulnak hozzá az ecetmuslica bazális membránjainak kiépítéséhez.⁷⁶ A PXDN már embrionális korban megjelenik az állatokban, és a részvételével képzett ECM meghatározó szerepet tölt be azok morfogenezisében, valamint a fejlődő idegrendszer részét képező ventrális idegcső kondenzációjában.⁸⁸ Kifejlett egyedekben a PXDN hiánya a bélrendszer bazális membránjaiban található kollagén IV hálózat felbomlásához vezet.⁴⁴

A másik modellorganizmus, amelyben részletesen vizsgálták a PXDN hiányának következményeit, a *Caenorhabditis elegans* örvényféreg volt. Ezekben az állatokban a PXDN két izoformája, a Pxn1 és Pxn2 is expresszálódik. A Pxn2 hiányában az egyedfejlődés számos fázisa hibásan megy végbe, aminek legfeltűnőbb velejárója az állat epidermisze és izomzata közötti kapcsolat integritásának megbomlása. A Pxn2 hiánya kifejlett állatokban a sérült axonok felgyorsult regenerációját eredményezte, ami arra utal, hogy az intakt ECM gátló hatást fejt ki ebben a folyamatban. Ugyanebben a vizsgálatban a Pxn1 hiánya önmagában nem járt fejlődési defektussal, azonban enyhítette a Pxn2 hiányában megfigyelhető fenotípust, amíg túlexpressziója súlyosbította azt, ami a két

fehérje közötti funkcionális antagonizmusra utalhat.⁸⁵ Egy másik munkacsoport ezzel szemben a Pxn1 expressziójának eltéréseivel közvetlenül összefüggésbe hozható, változatos megjelenésű idegrendszeri eltéréseket figyelt meg az állatokban.⁸⁹

A *Xenopus tropicalis* karmosbéka volt az egyik első alacsonyabbrendű gerinces faj, amelyben részletesen feltérképezték a PXDN expressziós mintázatát. Az állat egyedfejlődése során a PXDN mRNS több különböző szervben, köztük a vesetelepben, a velőcsőben és a farokrészben is megjelenik.⁹⁰ A közelmúltban *Danio rerio*ban (zebrahalban) is igazolták a PXDN embrionális fejlődés során betöltött központi szerepét. A PXDN csendesítésének hatására a zebrahalembriókban számos fenotípusos eltérés, így a szívtelep ödémája, csökevényes szemtelepek, a törzs elferdülése és a testfelszínen megjelenő foltok mintázatának durva eltérései alakultak ki.⁹¹

3.2.7.4. A PXDN ismert funkciói emlős szervezetekben

Az alacsonyabbrendű élőlényekhez hasonlóan a PXDN emlős szervezetben betöltött szerepének vizsgálatához is elsősorban a fehérje hiányában létrejövő eltérések nyújtottak támpontot. Két olyan humán genetikai vizsgálatot is publikáltak a közelmúltban, melyekben az anterior szegment diszgenezis (ASD) nevű, heterogén megjelenésű szemfejlődési rendellenesség egyes eseteinek a hátterében a PXDN-t kódoló gén mutációját azonosították oki tényezőként.^{92,93} A korneát, szklerát és az elülső szemcsarnokot érintő eltérések mellett néhány betegben a motoros rendszer fejlődésének késését és izomhipotóniát is leírtak.⁹² Az ASD-ben kialakuló szövettani elváltozásoknak a PXDN hiányával mutatott összefüggését később PXDN-deficiens egérmodell segítségével is igazolták, amelyben a humán betegekben leírt elváltozásokhoz nagyon hasonló szemfenotípus alakult ki.⁹⁴

Munkacsoportunk korábbi közleményében igazolta, hogy a humán pulmonális és dermális fibroblasztok TGF β -val történő kezelés hatására nagymennyiségű PXDN-t szekretálnak az ECM-be, ahol az fibrilláris kötegekbe rendeződik és részleges kolokalizációt mutat a fibronektinnel. A sejtkultúrában modellezett jelenség központi jelentőségű az egér vese uréterlekötés következtében végbemenő fibrotikus átépülésében, melynek során a PXDN mennyisége számottevően megnövekszik a veseszövet

peritubuláris terében.⁸⁰ Ez az eredmény felvetette a PXDN lehetséges részvételét a vesefibrózissal járó kórképek patogenezisében.

A PXDN-t VPO1-ként azonosító munkacsoport a fehérje kardiovaszkuláris rendszerben betöltött szerepét tanulmányozta. Eredményeik többek között egyes lipoproteinek oxidációjában, ezen keresztül pedig az érfal izomelemeinek kalcifikációjában,⁹⁵ az endotélsejtek apoptózisának indukciójában,⁹⁶ az érfali simaizomzat angiotenzin II által mediált proliferációjában⁹⁷ és az iszkémia-reperfúziót követő oxidatív károsodás kialakulásában⁹⁸⁻¹⁰⁰ valószínűsítik a PXDN részvételét. Ugyanez a csoport monomer formában vérplazmamintákban is kimutatta a fehérje szolubilis formáját, amelynek antimikrobiális funkciót tulajdonítottak.^{86,101}

3.2.8. A peroxidazin-szerű fehérje (PXDNL)

A PXDNL a PXDN homológja, melyet laborunk munkatársai azonosítottak, részletes karakterizálását pedig a dolgozat megírásához felhasznált társszerzős közlemény tartalmazza.¹⁰² A PXDN-hez hasonlóan a PXDNL is két eltérő néven szerepel a szakirodalomban, a vaszkuláris peroxidáz 2 (VPO2) megjelölés létjogosultságát azonban ebben az esetben sem támasztják alá a rendelkezésre álló expressziós adatok.⁸¹

A PXDNL a PXDN-hez hasonlóan nagyméretű, komplex szerkezetű fehérje, amely mind doménszerkezetét, mind szekvenciáját tekintve nagymértékű egyezést mutat a PXDN-nel, azonban azzal szemben nem rendelkezik mérhető peroxidázaktivitással. A PXDNL peroxidáz doménjének aminosavsorrendjében két, a többi emlős hem-peroxidáz szekvenciájában konzervált glutamin és aszpartát reziduumot érintő eltérést is tartalmaz, melyek a hemkötést és ezáltal vélhetően a katalitikus aktivitást is befolyásolják, és valószínű magyarázatát adják a peroxidázaktivitás hiányának.¹⁰² Egy közelmúltban megjelent közlemény szerzői számos humán sejtvonalban azonosítottak egy, a *Xenopus tropicalis* PMR1 endonukleázával homológ génterméket, amelyet a PXDNL alternatív mRNS splicing során kialakuló, rövidebb izoformájaként írtak le.¹⁰³ Az N-terminálisan trunkált PXDNL izoforma létezését ezidáig más munkacsoport nem erősítette meg.

A PXDNL-t kódoló gén hiányzik a rágcsálók genomjából, ami megnehezíti a fehérje funkciójának és lokalizációjának megfelelő kontrollok mellett történő vizsgálatát, és ezekre a célokra humán sejtek és szövetek tanulmányozását teszi szükségessé.

Ubikviter kifejeződésű homológjával szemben a humán PXDNL a szívre korlátozódo expressziót mutat. Munkatársaim a PXDNL-t kifejező sejttípusok azonosítása céljából végzett *in situ* hibridizációs kísérletekben kardiomiocitákban detektáltak PXDNL-specifikus jelölődést. Szívizommetszetek immunfestésével kapott eredmények alapján a fehérje az interkaláris korongokban és a kardiomiociták oldalsó membránja mentén helyezkedik el, indukált pluripotens őssejtből (iPS) származó szívizomsejtekben, valamint a rekombináns fehérjét expresszáló Cos7 sejtekben azonban a PXDNL az endoplazmás retikulumban is nagy mennyiségben volt detektálható.¹⁰²

A PXDNL-nek a szívben betöltött élettani funkcióját egyelőre nem ismerjük. Dilatatív kardiomiopátiás (DCM) betegekből származó szívizommintákban a PXDNL mRNS megnövekedett mennyisége mutatható ki, ami felveti a fehérje esetleges közreműködését a kórállapot kifejlődésében. Az iPS-eredetű kardiomiociták angiotenzin II-vel történő kezelése is hasonló eredményre vezetett, ami azért lehet érdekes, mert a DCM patomechanizmusában az angiotenzin II központi jelentőséggel bír. Munkatársam rekombináns fehérjék *in vitro* vizsgálata során a PXDNL jelenlétének gátló hatását mutatta ki a PXDN enzimaktivitására, ami felveti az endogén PXDN és PXDNL közötti antagonizmus lehetőségét a mindkét fehérjét expresszáló szívizomzatban.¹⁰²

3.2.9. Az emlős hem-peroxidázok és NADPH-oxidázok együttműködése

Az emlős hem-peroxidázok hatékony működésének feltétele a megfelelő H₂O₂-ellátottság, amit a legtöbb enzim esetében egy jól definiált ROS forrás biztosít. A hem-peroxidázok többnyire igen szoros kooperációban működnek a NADPH-oxidáz enzimcsalád egyes képviselőivel, így az MPO és az EPX a Nox2-vel, az LPO a különböző szövetekben eltérő megoszlást mutató Duox1-gyel vagy Duox2-vel, a TPO pedig a Duox2-vel. Ezt az is alátámasztja, hogy sok esetben a peroxidáz enzim hiányából vagy alulműködéséből fakadó tüneteknek megfelelő, vagy annál súlyosabb fenotípus alakul ki az együttműködő NADPH-oxidáz hiányában, így például a TPO és a Duox2 enzimkomplex tagjainak kiesése egyaránt hipotireózis kialakulásához vezet.^{42,104}

A Nox/Duox enzimekre és a hem-peroxidázokra egyaránt jellemző, korlátozott szöveti eloszlás meghatározó a kooperációban kialakuló hatások megjelenése szempontjából a szervezetben. A NADPH-oxidázok – regulált ROS-forrás lévén – a hem-

peroxidázok működésének szabályozásához is hozzájárulhatnak a H_2O_2 szubsztrát elérhetőségének befolyásolásával, ami növelheti az általuk közvetített hatás specificitását. A NADPH-oxidázok ROS termelésének sok esetben feltétele egyes citoszolikus vagy membránkötött szabályozófehérjék jelenléte is, így a hem-peroxidázokkal kialakított hatékony együttműködéshez ezek jelenléte is elengedhetetlen. Az egyes peroxidázok által atípusos lokalizációban létrehozott kórélettani hatások szempontjából lényeges kérdés, hogy milyen hatékonysággal tudnak eltérő forrásból származó H_2O_2 -ot felhasználni ezek az enzimek. A fehérjecsalád többi tagjával szemben széleskörű szöveti eloszlást mutató PXDN esetében ezidáig nem azonosítottak együttműködő NADPH-oxidázt vagy más, ROS előállítására alkalmas molekulapartner, így egyelőre a fehérje által katalizált kollagén IV keresztkötési reakcióban is ismeretlen a H_2O_2 forrása.

3.3. Az extracelluláris mátrix (ECM) és a bazális membránok

A kutatásunk fókuszában álló PXDN extracelluláris mátrixok (ECM) kialakításában felismert jelentőségét mára számos, az előző fejezetben tárgyalt irodalmi forrás igazolja. A bemutatott eredmények háttérének megvilágítása érdekében a következőkben a szövetek acelluláris állományát képező ECM általános jellemzőit mutatom be, majd az annak különleges megjelenési formáját jelentő bazális membránok felépítését, jellegzetes funkcióit és az azokat érintő kórállapotokat tekintem át.

3.3.1. Az ECM általános jellemzői

Az ECM minden szolid szervben megjelenő, sejten kívüli állomány, amely nagymértékben meghatározza az adott szövet mechanikai és sok esetben funkcionális jellegzetességeit is.^{105,106} Amellett, hogy az ECM komponenseiből felépülő hálózat strukturális vázat biztosít a szövetekben található sejtes elemek számára, elengedhetetlen szerepet tölt be a környezetből származó kémiai és mechanikai jelzések továbbításában is. Ezek az információk az egyedfejlődés során alapvető jelentőségűek a kapcsolódó sejtek differenciálódásának irányításában és az egyes szervekre jellemző szöveti struktúra kialakításában, és a későbbiekben is esszenciálisak a szöveti homeosztázis fenntartásához. Az ECM állományát különböző struktúrfehérjék, glikoproteinek és

proteoglikánok alkotják, emellett jelentős mennyiségű poliszacharid jellegű molekula is megjelenik a sejten kívüli térben. Ezek a molekulák erősen hidrofíl karakterüknek köszönhetően nagymennyiségű víz megkötésére képesek, ezáltal pedig a sejten kívüli víztér ún. „gélfázisának” létrehozásához is hozzájárulnak. A jellegzetes doménszerkezetüknek köszönhetően mátrixfehérjeként klasszifikált alkotók sok esetben több izoformával is rendelkeznek. Ezek változatos megoszlása, az egyes mátrixkomponensek eltérő aránya, valamint a belőlük kiépülő rendszer szerveződésének és elhelyezkedésének különbségei nagy diverzitást biztosítanak az egyes szövetekre jellemző ECM-eknek, aminek kialakítása és fenntartása a mátrix és a szöveti sejtek folyamatos reciprok interakcióin alapul.¹⁰⁷ A sejtek adhéziós integrin és diszkoidin domén receptoraikon, valamint sejt felszíni proteoglikán koreceptoraikon keresztül kapcsolódnak az ECM alkotóihoz. Ez a molekuláris kölcsönhatás számos intracelluláris szignalizációs útvonalon keresztül befolyásolja a sejtek viselkedését, emellett indirekt összeköttetést létesít azok citoszkéletális hálózata és az ECM között.¹⁰⁸ Az ECM fehérjéire nagy általánosságban jellemző poszttranszlációs módosítások sokasága alapvetően befolyásolja azok szerkezetét és ennek következtében az általuk ellátott feladatokat is.¹⁰⁹ Az ECM konzisztenciájával szembeni elvárások mellett a szövetet dinamikus érő környezeti változások és funkcionális kihívások a mátrix szerkezetének folyamatos átépülését (remodelling) követelik meg, ami számos, az ECM fehérjék szerkezetének módosítására specializálódott extracelluláris enzim működésének eredményeképpen, fiziológiás körülmények között jól szabályozott formában valósul meg. Az ECM-felépítés és -degradáció egyensúlyának megbomlása, illetve a szabályos mátrixszerkezet elvesztése több összetett kórélettani folyamatban központi tényező. Az ECM komponensek túlzott mértékű felszaporodása az adott szövet fibrotikus átépüléséhez vezet, amíg számos különböző belgyógyászati és immunológiai kórkép jár együtt a mátrix generalizált vagy lokalizált pusztulásával.¹⁰⁵ A szerkezeti integritás elvesztésének következményei jól nyomon követhetőek egyes szövetek tumoros átalakulása során, amikor a transzformálódott sejtekből származó szignálok a normál szöveti szerkezet megtartása helyett a tumor lokális és metasztatikus terjedésének kedvező, szabálytalan ECM mikrokörnyezetet alakítanak ki.¹¹⁰

3.3.2. Az ECM fajtái és összetétele

Szerkezetük és funkcionális jellegzetességeik alapján az ECM-nek két típusát, az intersticiális mátrixot és a bazális membránokat különböztetjük meg. Az intersticiális mátrix kevésbé kompakt szerkezetű és molekuláris összetételét tekintve is heterogénebb struktúra, aminek elsődleges feladata a szövetek szerkezeti vázának kialakítása. A bazális membránok az epitél és endotél sejtrétegek alatt lapszerűen megjelenő, a zsír-, harántcsíkolt izom- és szívizomsejteket beborító, valamint a perifériás idegrostokat burkoló tömör, lapszerű képződmények, melyek azon túl, hogy mechanikai stabilitást nyújtanak a rajtuk fekvő sejtek számára, az extracelluláris tér állapotában bekövetkező változásokat is közvetítik az irányukba.^{111,112} Ebben az alfejezetben az ECM-re általánosságban jellemző komponenseket mutatom be, a bazális membránok szerveződését és összetett funkcióit pedig a következő alfejezetben ismertetem.

Az ECM fibrilláris struktúrfehérjékből, proteoglikánokból, glikoproteinekből és glükóz-aminoglikánokból (GAG) épül fel, melyek változatos doménjeik és funkcionális csoportjaik segítségével a sejtfelszíni ECM receptorokkal és egymással is többszörös interakciókat alakítanak ki.^{111,112} A mátrix térfogatának jelentős részét kitevő GAG és proteoglikán molekuláknak sokáig csak passzív, helykitöltő szerepet tulajdonítottak, jelenlegi tudásunk szerint azonban utóbbiak az extracelluláris térből a sejtek irányában történő információtovábbításban is szerepet játszanak. A GAG molekulák ismétlődő, egy aminocukor és egy uronsav alkotta diszacharid egységekből álló, el nem ágazódó cukorláncok, melyek sok esetben szulfát csoporttal is kiegészülnek, és epimerizációval és deacetilációval is módosulhatnak. A csoportba tartozó hialuronsav nem kapcsolódik fehérjékhez, a kondroitin-szulfát, dermatán-szulfát, heparán-szulfát és keratán-szulfát azonban igen, amelyek ezáltal proteoglikánok kialakításában vesznek részt. A GAG molekulák, azon belül is elsősorban a heparán-szulfát növekedési faktorok kötésén keresztül járul hozzá azok ECM-ben történő szekvesztrációjához.¹¹³ A GAG-ok specifikus fehérjemaghoz történő kapcsolódásával létrejövő proteoglikánokat szerkezeti jellegzetességeik és lokalizációjuk alapján a kisméretű, leucinban gazdag (dekorin, lumikán), a moduláris (perlekán, aggregán) vagy a sejtfelszíni (szindekán, gliplikán) proteoglikánok közé soroljuk.¹¹⁴ Mechanikai szerepükön túl az első két csoport tagjai a

sejtmembrán receptoraihoz kötődve intracelluláris jelátviteli utakat befolyásolnak, a utóbbiak pedig koreceptorként rögzítik az ECM elemeit a plazmamembránhoz.¹¹⁵

Az ECM két legfontosabb fibrilláris komponense a kollagén és az elasztin, melyek közül a kollagén elsősorban a szövetek szakítószilárdságáért, az elasztin pedig a rugalmasságáért felel. A kollagén az ECM legnagyobb mennyiségben előforduló alkotója, amely egyes szövetekben a teljes fehérjetömeg 30%-át is kiteheti. Gerincesekben ezidáig 28 különböző típusú kollagént azonosítottak, melyeket az általuk kialakított szupramolekuláris szerkezet alapján négy csoportba sorolunk.¹¹⁶ A fibrilláris kollagének kisebb szálak kialakítását követően szerveződnek nagyobb kollagén kötegekbe. A fibrillum-asszociált kollagének maguk nem képeznek hasonló kötegeket, de a fibrilláris formákhoz kapcsolódva segítik azok pozicionálását a komplex ECM-ben. Ezek mellett megkülönböztetünk ún. transzmembrán kollagéneket, illetve a köteges szerkezet helyett kétdimenziós hálót képző formákat is, melyek a bazális membránok kialakításában vesznek részt. A különböző típusú kollagének többnyire keverten jelennek meg a szövetek ECM-jében, de mindig van egy dominánsnak tekinthető típus, ami meghatározza a hálózat jellegzetességeit.¹¹⁶ A kollagének közös szerkezeti jellemzője, hogy a polipeptidláncok tripla hélixbe rendeződve alkotnak funkcionális alegységeket. Az ún. kollagenózus domén 3 aminosavból álló Gly-X-Y ismétlődéseket tartalmaz, ahol az X többnyire prolin, az Y pedig poszttranszlációs hidroxiláción átesett 4-hidroxi-prolin. A kollagének érésük során soklépéses poszttranszlációs módosuláson mennek keresztül, aminek a propeptidek lehasadásán túl részét képezi a lizin és prolin aminosavak hidroxilációja, egyes lizinek glikozilációja, illetve a kollagénfibrillumok lizil-oxidázok segítségével történő kovalens keresztkötése is.¹⁰⁹ A szintén fibrilláris szerkezetű elasztin tropoelasztinként szekretálódik az extracelluláris térbe. Itt a lizil-oxidáz család tagjainak segítségével többszörös kovalens keresztkötések alakulnak ki az egyes elasztin molekulák között, ami a belőlük épülő kötegek szerkezetét stabilizálja. Ezek az extracelluláris térben a kollagénhez asszociálódnak, felszínükhöz pedig a fibrillin nevű glikoproteinekből képzett szálak kapcsolódnak.¹¹⁷

Az ECM alkotásában számos glikoprotein, így a fibronektin, laminin, trombospondin, nidogén/entaktin és tenascin is részt vesz, melyeknek struktúrális szerepükön kívül sok esetben jelközvetítő funkciója is van. Ezek a molekulák szintén hozzájárulnak a növekedési faktorok ECM-ben történő rögzítéséhez, ami által egy

proteolízis segítségével felszabadítható forrást biztosítanak. Egyes proteoglikánoknak az ECM átépülése során keletkező proteolitikus hasítási termékei sokszor a teljes molekuláétól eltérő, különálló biológiai funkcióval bírnak, ami a megváltozott környezeti feltételek sejtek irányába történő közvetítésében bír jelentőséggel.^{115,118} A fibronectin dimer formában szekretálódó glikoprotein, amelynek két alegységét egy diszulfidhíd tartja össze. Az ECM-be beépülő fehérje szintén köteges elrendeződést mutat, emellett azonban a fibronectin a keringésben is megjelenik.¹¹⁹ A fibronectin kötegek speciális tulajdonsága, hogy megnyúlásukkal korábban rejtett integrinkötő helyek kerülnek expozícióra a fehérjeláncban, amelyek megfelelő adhéziós receptorokhoz kötődve befolyásolhatják a sejtek viselkedését. Ez a jelenség képezi az alapját a fibronectin ECM-ben betöltött specifikus mechanoszenzor funkciójának.¹²⁰ A tenascin molekula N-terminális diszulfidhidakon keresztül hattaágú szimmetrikus komplexet, ún. hexabrachiont képez, és többek között a fibronectin integrinkötő régióihoz kapcsolódva fejt ki antiadhezív hatást.¹²¹ Az elsősorban bazális membránokban megjelenő lamininek heterotrimer fehérjék, melyek különböző α , β és γ láncok kombinációjából épülnek fel, és 3 rövid és egy hosszú karból álló, kereszt alakú szerkezetbe rendeződnek. Az α -láncok C-terminálisan elhelyezkedő, globuláris doménje a fehérje integrin- és disztroglikánkötésében, valamint a heparán-szulfát asszociációjában játszik szerepet.¹²²

Az említettek mellett az ECM-ben számos, a szöveti sejtekből szekrécióra kerülő, elsődlegesen nem-mátrix fehérje is megjelenik, melyek közül többen az ECM ki-, illetve átépüléséhez járulnak hozzá. Ilyenek a mátrixfehérjék keresztkötésére specializálódott enzimek, így például a lizil-oxidázok (LOX, LOXL) vagy a transzglutaminázok.¹²³ A mátrix állandó remodellingje számos fehérjehasító enzim, így mátrix metalloproteinázok (MMP), dezintegráló és metalloproteináz enzimek (ADAM, ADAMTS) és meprinnek közreműködésével megy végbe, amelyek aktivitását metalloproteináz-inhibitorok, többek között a mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor (TIMP) korlátozzák.¹²⁴⁻¹²⁷

Az ECM kialakításában résztvevő molekulákról adott áttekintő kép nem lehet teljes azok sejt felszíni receptorai nélkül. Az erre specializált integrinek, disztroglikánok, illetve a Lutheran glikoprotein számos különböző ligandumot köthetnek az extracelluláris térben, amelyek mennyiségi és szerkezeti viszonyait az említett receptorokról induló jelátviteli útvonalak közvetítik a sejt irányába.¹⁰⁸ Emellett több membránkötött proteoglikán, így a szindekán és a gliplikán is koreceptorként kapcsolhatja a sejt felszínhez

az ECM egyes komponenseit.¹²⁸ A receptorok jellegzetes sejt-ECM kapcsoló struktúrákba, így fokális kontaktusokba vagy hemidezmoszómákba rendeződhetnek, ami a receptorok klaszterbe szervezésével hatékonyabb jeltovábbítást tesz lehetővé.¹²⁹

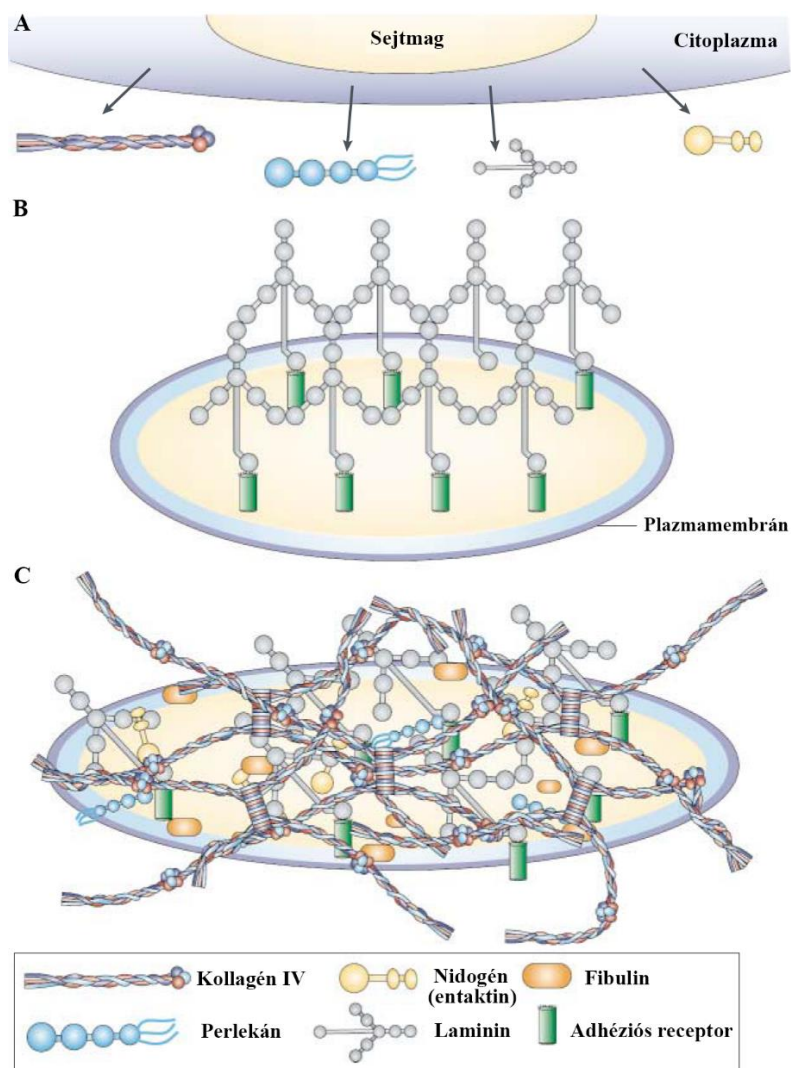
3.3.3. A bazális membránok szerkezetének kialakulása

A szervezet különböző részein elhelyezkedő bazális membránok mechanikai és információközvetítő szerepükön túlmenően sok esetben szervspecifikus funkciókat is ellátnak, melyek különleges szerkezeti igényeket támasztanak ezzel a struktúrával szemben. Az 50-100 nm vastagságú bazális membránok elektronmikroszkópos megjelenésük alapján többnyire két rétegre, a lamina lucidára és a lamina densára oszlanak, amelyek elsősorban morfológiai alapon különböztethetőek meg egymástól.

A bazális membránok összetételével kapcsolatos tudásunk alapjai az Engelbrecht-Holm-Schwarm (EHS) szarkóma sejtvonal által termelt ECM tanulmányozásából származnak.¹³⁰ Ennek komponensei ugyan többnyire azonosak a bazális membránok alkotóival, azok mennyiségi és szerkezeti viszonyai azonban jelentősen eltérnek a fiziológias állapottól.¹³¹ Az EHS sejtek által termelt mátrix tisztított formája Matrigel néven a kereskedelmi forgalomban is elérhető, ami sejt kultúrában és ún. Matrigel pluggal végzett állatkísérletekben is jól használható az ECM modellezésére. A bazális membránok legfőbb alkotóelemei a kollagén IV, különböző laminin izoformák, heparán-szulfát proteoglikánok (pl. perlekán), és a nidogén/entaktin, a minor komponensek pedig az agrin, a fibulin, a kollagén XV, valamint a kollagén XVIII, amelyek mellett további, sok esetben szervspecifikus megjelenésű összetevő is előfordulhat.

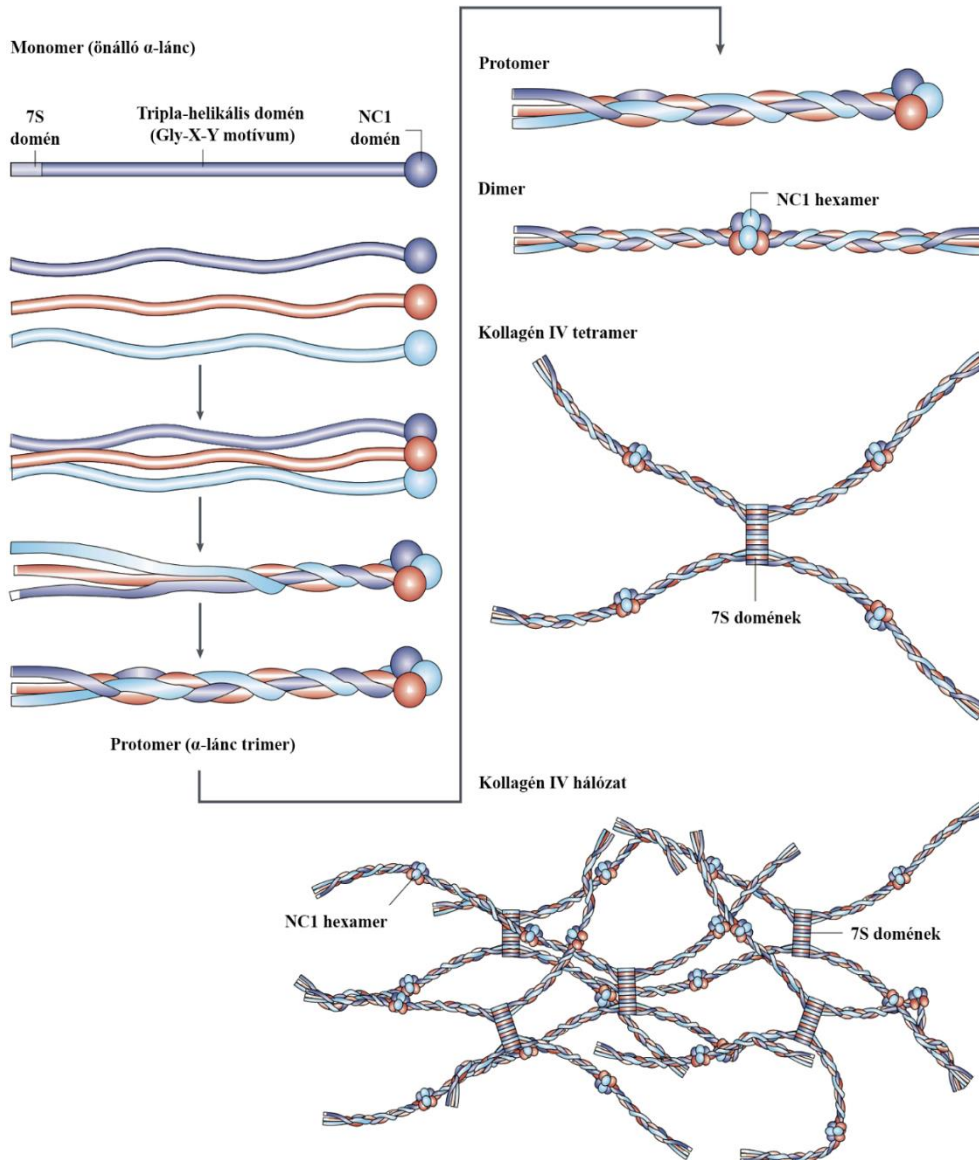
A bazális membránok fehérjehálózatának kialakulása az alkotóelemek jellegzetes szerkezete által irányított módon, ún. „self-assembly” során megy végbe.¹¹² Ennek során az egyes komponensek kötésére alkalmas sejtfelszíni receptorok horgonyként szolgálva segítik a további molekulák megfelelő pozícióban és orientációban történő asszociációját. A bazális membránok kiépülésének első lépése az alkotóelemek funkcionális egységekbe történő szerveződése az intracelluláris térben. Ez a kollagén IV esetében a három láncból felépülő ún. protomerek, a lamininnál pedig a heterotrimer szerkezet kialakulását jelenti (12.A ábra). Az extracelluláris térbe szekretálódott fehérjék közül a laminin sejtfelszíni receptorokhoz történő asszociációja indítja meg a bazális membrán összeépülésének

folyamatát (12.B ábra). A plazmamembránhoz integrineken és disztroglikánokon keresztül rögzített laminin polimer a továbbiakban is vázként szolgál a többi komponens kapcsolódásához annak ellenére is, hogy azok többsége maga is rendelkezik az adhéziós receptorok felismerési motívumaival. A különállóan szerveződő kollagén IV polimer nidogén/entaktin hidakon keresztül kapcsolódik a lamininhoz, bár egyes források szerint a két fehérjehálózat között direkt interakció is létrejön.^{132,133} A bazális membrán további komponensei a két domináns fehérje által alkotott vázhoz kapcsolódva járulnak hozzá a szerkezetileg és funkcionálisan is érett bazális membrán összeállításához (12.C ábra).



12. ábra: A bazális membrán szerkezetének kialakulása (¹¹² módosításával). Az ECM fehérjék funkcionális alegységeinek összeállítását követően (A) a laminin adhézios receptorokhoz történő asszociációjával indul meg a bazális membrán kiépülése (B). A laminin polimerhez nidogén/entaktin hidakon keresztül kapcsolódik a függetlenül szerveződő kollagén IV hálózat. Az így kialakult fehérjevázhoz további glikoproteinek (pl. fibulin) és proteoglikánok (pl. perlekán) kapcsolódnak (C).

A bazális membrán stabilitása szempontjából igen lényeges a kétdimenziós kollagén IV hálózat megfelelő struktúrájának kialakítása, amit a kollagén IV szerkezeti jellegzetességei irányítanak.¹¹² Az emlősökben hat különböző kollagén IV izoforma expresszálódik, melyeket α -láncoknak nevezünk. Az α -láncok megoszlása az egyes szövetekben eltérő, ami különböző összetételű kollagén IV komplexek kialakulásához vezet. A polipeptidláncok három funkcionális motívumra, a C-terminális 7S doménre, a fehérje legnagyobb részét kitevő, klasszikus Gly-X-Y ismétlődéseket tartalmazó kollagenózus doménre és az N-terminálisan található, globuláris szerkezetű nem-kollagenózus NC1 doménre oszlanak. A kollagén IV trimerek összerendeződése az NC1 doméneken keresztüli asszociációval indul meg, majd a három lánc α -helikális régióinak összetekeredését követően a 7S domének találkozásával zárul le. A meghatározott α -láncok részvételével kialakuló, diszulfidhidakkal is megerősített funkcionális alegységeket protomereknek nevezük. Ezt követően két protomer C-terminálisának találkozásával NC1 hexamerek alakulnak ki, az N-terminális 7S doménekből alkotott komplexhez pedig további három hasonló szerkezetű molekularészlet kapcsolódik, ezáltal tetramer szerkezetet formálva. Az említett interakciók képezik a kollagén IV hálózat kialakulásának alapját, a másodrendű kémiai kötésekön kívül azonban további, kovalens kötések is szerepet játszanak annak megszilárdításában (13. ábra). Az extracelluláris LOX és LOXL enzimek a kollagén lizin és hidroxilizin oldalláncainak oxidatív dezaminálásával indított kondenzációs reakciókon keresztül alakítanak ki kovalens keresztkötéseket az egyes láncok között.¹²³ Emellett a közelmúltban derült fény arra, hogy a munkacsoportunk érdeklődésének középpontjában álló PXDN az NC1 hexamerek kovalens keresztkötésével járul hozzá azok stabilizálásához.⁴⁴



13. ábra: A bazális membrán kollagén IV hálózatának kialakulása ⁽¹²⁾ módosításával). Hatféle kollagén IV izofomát ismerünk, melyek egy NCI doménből, egy hosszú kollagenózus régióból és egy 7S doménből épülnek fel. A kollagén IV funkcionális alegységeinek, a protomereknek a kialakítása három α -lánc NCI doménjeinek kapcsolódásával indul meg, majd kollagenózus doménjeik feltekeredésével válik teljessé. Az extracelluláris térben két összefekvő protomer NCI doménjeinek asszociációjával hexamer szerkezet alakul ki, a 7S domének pedig tetramerekbe rendeződnek. A így létrejövő kollagén IV hálózatot ezt követően számos, a fehérje eltérő szakaszain kialakuló kovalens kötés is megerősíti.

3.3.4. A bazális membránok fiziológiás funkciói és kóreltani eltérései

A bazális membránok integritása minden egyes szerv megfelelő fejlődéséhez és működéséhez elengedhetetlen feltétel. A bazális membránok az egyedfejlődés során elsőként megjelenő formája a Reichert-membrán, valamint az embriópajzsban kialakuló ECM lemez.¹¹¹ Az utóbbi struktúra központi szereppel bír az epiblasztok polarizációjának és az embrionális testben megkezdődő üregképződésnek az irányításában, és a hozzá kapcsolódó sejtekben az apoptotikus folyamatok kialakulását is hatékonyan gátolja. A korai morfogenezis befolyásolásán túl az intakt bazális membránok a későbbi organogenezis során a differenciált szöveti struktúra kialakításához is elengedhetetlenek.

A bazális membránok különleges formája található meg a vese glomerulusaiban. A glomeruláris bazális membrán (GBM) a podociták és a glomeruláris kapillárisok endotélsejtjeinek közös terméke, amely a szűrletképzés folyamatában negatív töltésű filtrációs barrierként szolgál.¹³⁴ Az egyedfejlődés során a GBM kollagén és laminin izoformaprofilja megváltozik, ami mind annak szűrőfunkciója, mind a glomeruláris sejt típusok szabályos elrendeződésének megőrzése szempontjából lényeges tényező. A membrán töltésszelektivitásának kialakításában sokáig a heparán-szulfát proteoglikánokat tartották központi tényezőnek, ezt a feltételezést azonban a későbbi vizsgálatok nem támasztották alá. Számos genetikai eredetű kórkép jár együtt a GBM szerkezetének megbomlásával (pl. Alport-szindróma), mások pedig autoimmun mechanizmussal vezetnek annak károsodásához (pl. Goodpasture-szindróma). A GBM szűrőfunkciójának romlását előidéző, változatos etiológiájú kórképek nefrózis-szindróma kialakulásához vezetnek. Egyes szisztémás betegségek, így a diabétesz és a hipertónia indirekt módon befolyásolja a GBM szerkezetét, ami a vesefunkciót érintő szövődmények kialakulásához vezethet.¹¹¹

A bazális membránok a sejtadhézió és migráció befolyásolásán keresztül központi szerepet játszanak az epidermisz-dermisz kapcsolatok kialakulásában alacsonyabbrendű élőlényekben és emberben egyaránt. Egyes autoimmun betegségek, így például a bullózus pemphigoid bőrtüneteinek kialakulásában a bőr bazális membránjának alkotóihoz kapcsolódó autoantitesteknek tulajdonítanak szerepet.¹³⁵

A harántcsíkolt izomrostokat körülvevő ECM fehérjestruktúrák az izomösszehúzás során kialakuló mechanikai stressz közvetítését és egyenes

eloszlását biztosítják. Az izomban található bazális membrán és a miociták kapcsolódásában résztvevő egyes fehérjék (pl. a disztrofin) genetikai eredetű funkcióvesztése vagy hiánya izomdisztrófia kialakulását eredményezi.¹³⁶

A központi és perifériás idegrendszer differenciációjában és szerkezetének fenntartásában egyaránt szerepet játszanak a főként egyes gliasejtípusok által szintetizált bazális membrán struktúrák. Az agyszövet fejlődése során a pia mater alatt kialakuló bazális membrán radiális gliasejtekkel kialakított kapcsolatain keresztül irányítja az idegsejtek migrációját és rétegzett elrendeződését, a Schwann sejtek által termelt ECM pedig a perifériás axonok növekedését és regenerációját befolyásolja.¹³⁷

Az érendotél alatt húzódó bazális membrán a különböző érszakaszok esetében eltérő jelentőséggel bír, melyek közül élettani szempontból a mikrocirkulációs régióhoz köthető funkciók a leglényegesebbek. A bazális membránok barriert jelentenek a gyulladáshoz vezető szövetekben az erekből transzmigrációval kilépő leukociták számára. A primer és szekunder érújdonképződési reakciók során a bazális membránok szerkezetének dezintegrációjával indul meg az új érképződmények fejlődése. Egyes szolid tumorok a szövetet ellátó erek bazális membránjának mechanikus és enzimikus megbontásával teszik lehetővé a daganatos sejtek tápanyagellátását biztosító új erek kialakulását, valamint a tumorsejtek lokális szóródását és távoli áttétek képzését.¹³⁸

3.4. Állati hem-peroxidáz enzimek szerepe az ECM szintézisében

A reaktív oxigénszármazékok élő szervezetben betöltött ellentmondásos szerepe jól tetten érhető az ECM molekuláival kialakított kölcsönhatások változatosságában és azok sokszor éppen ellentétes kimenetelében. Több korábbi *in vitro* vizsgálatban is igazolást nyert, hogy egyes oxigéntartalmú intermedierek az ECM-et alkotó fehérjékkel és proteoglikánokkal közvetlen interakcióba lépve azok aspecifikus oxidációját, majd következményes degradációját okozhatják.¹³⁹⁻¹⁴³ Több, az ECM-et is érintő összetett kórélettani folyamat, így az érlemezés, szöveti fibrózis, tumornövekedés és áttétképzés, érújdonképződés, illetve egyes autoimmun és gyulladáshoz vezető kórképek kialakulásában is centrális szerepet tulajdonítanak az érintett szöveteket károsító kontrollálatlan ROS hatásoknak.¹⁴⁴⁻¹⁵⁰ Az utóbbi években azonban az is világossá vált, hogy az ECM fiziológiás homeosztázisának is fontos tényezői a térben és időben regulált

ROS szintézissel és felhasználással járó folyamatok, melyek alacsonyabbrendű élőlényekben és gerincesekben is sok esetben peroxidáz enzimek közreműködésével valósulnak meg.

Ennek egyik ismert példáját *Caenorhabditis elegans*-ban írták le, ahol az állat kutikuláját stabilizáló ditirozinhidak a Duox1 enzim által katalizált reakcióban alakulnak ki.¹⁵¹ A fonalféregben kifejeződő Duox1 humán ortológjának megfelelően egy hibrid szerkezetű molekula, amely H₂O₂ előállítására képes NADPH-oxidáz doménje mellett egy peroxidázszerű domént is tartalmaz. A keresztkötési reakcióról alkotott modell szerint a NADPH-oxidáz domén által termelt H₂O₂-ot a peroxidázszerű domén használja fel az ECM fehérjék ditirozinhidakon keresztül történő összekapcsolására. A Duox1 hiányában megfigyelt fenotípusos eltérések – így a kutikula felhólyagosodásának és az állatok mozgásbeli akadályozottságának – megjelenése alapján azonban nem egyértelmű, hogy azok kialakulása a fehérje vélt peroxidázaktivitásával is összefüggésben van-e, vagy egyszerűen a kieső ROS forrás hiányából következik. A Duox enzimek a peroxidáz doménnek megfelelő régióban a katalitikus aktivitás szempontjából esszenciális reziduumokat érintő eltéréseket tartalmaznak az állati hem-peroxidázok aminosavsorrendjéhez képest, ami alapján az lenne feltételezhető, hogy a fehérjék nem rendelkeznek peroxidázaktivitással.¹⁵² Ezzel szemben az említett közlemény szerzői *in vitro* körülmények között a *C. elegans* és a humán Duox1 fehérje rekombináns formájának peroxidázaktivitását is kimutatták, amit később egy másik munkacsoportnak két, a peroxidáz domén hemkötését befolyásoló mutáció vizsgálatával is sikerül megerősítenie.¹⁵³ A két megfigyelés közötti ellentmondás feloldását jelenthetné egy, a Duox1 peroxidáz doménjére jellemző alternatív katalitikus mechanizmus igazolása, ezt a felvetést azonban ezidáig nem sikerült biokémiai vizsgálatokkal alátámasztani.

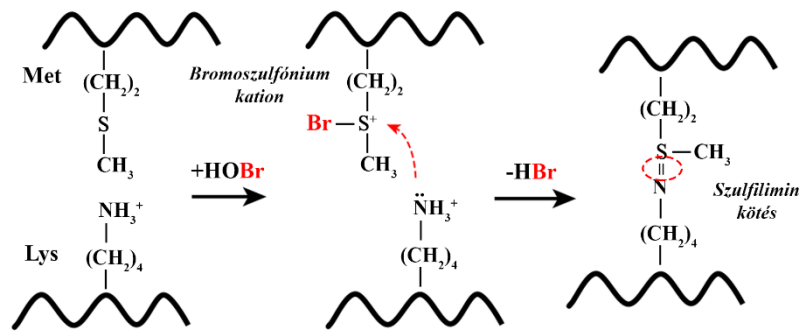
Szintén egy peroxidáz enzim, az ovoperoxidáz (OPO) részvétele igazolódott a tengeri sün petesejt megtermékenyítése kapcsán kialakuló ECM módosulások hátterében.^{154,155} A megtermékenyítést követően a petesejt körül elhelyezkedő glikoprotein köpeny alkotói ditirozinhidakon keresztül többszörösen keresztkötött állapotba kerülnek, ami mind a zigóta mechanikai védelme, mind a polispermia akadályozása szempontjából előnyös a sejt számára. A petesejt és a spermium találkozását követően a kortikális granulumban tárolt OPO enzim a petesejt felszínére ürül, ahol peroxidázaktivitását a Duox homológ Udx1 által termelt H₂O₂ felhasználásával

fejt ki.^{156,157} Ebben a példában tehát két különálló enzimhez köthető a peroxidáz reakció kivitelezése és az ahhoz szubsztrátként szolgáló oxigéntartalmú intermedier előállítása.

A klasszikusan ismert emlős hem-peroxidázok szövetspecifikus expressziója és jól definiált funkciói valószínűtlenné tették azok fiziológiás szerepét hasonló oxidatív keresztköti folyamatokban. A gyulladásos szövetben felszaporodó neutrofil granulocitákból és makrofágokból felszabaduló, vagy a keringésből transzcitózissal a szubendoteliális mátrixba jutó mieloperoxidáz (MPO), illetve az eozinofil granulocitákból származó eozinofil peroxidáz (EPX) által katalizált aspecifikus oxidatív reakciók részvételét mind a mátrixfehérjék túlzott termelésével jellemezhető fibrotikus folyamatokban, mind azok degradációjával járó kóros állapotok patogenezisében leírták, ezek a fehérjék azonban élettani körülmények között nem játszanak szerepet az ECM szerkezetének és működésének befolyásolásában.¹⁵⁸⁻¹⁶² Az ubikviter előfordulású, számos mátrixfehérje-jellegzetességet hordozó PXDN megismerése azonban felvetette annak a lehetőségét, hogy egy kifejezetten ECM-módosításra specializált hem-peroxidáz enzim is részt vehet az extracelluláris mátrix és a bazális membránok fiziológiás szerkezetének kialakításában. A PXDN hiányában mind emberben, mind számos különböző állatfajban és humán egyedekben is előforduló, az ECM-et is érintő fenotípusos eltérések sok esetben összhangban voltak más mátrixfehérjék, így elsősorban kollagének mutációja esetében megfigyelhető elváltozásokkal.¹⁶³⁻¹⁶⁷ A PXDN ugyan képes ditirozinkötések kialakítására, azonban ennek esetleges fiziológiás jelentőségét ezidáig nem ismerjük.⁷⁶ A közelmúltban azonosították azt az enzimreakciót, ami a bazális membránokban kiépülő kollagén IV hálózat szerkezetét és a PXDN funkcióját összekapcsolja. A PXDN által katalizált reakció során a bazális membránban összefekvő két kollagén IV protomer NC1 doménjei között kovalens keresztköti alakul ki, ami kémiai jellegét tekintve egyedülálló az élő szervezetben.^{44,91} A konzervált, 93-as pozíciójú metionint a 211-es helyen található lizinnel vagy hidroxilizinnel összekapcsoló szulfiliminkötés kialakulásához elengedhetetlen a Br⁻ részvétele a reakcióban, ami a Br⁻ élő szervezetben betöltött esszenciális szerepének első bizonyítékát jelenti (14. ábra).⁸⁷

A PXDN által katalizált keresztköti *in vivo* jelentőségét ezidáig csak *Drosophila melanogaster*-ben és *Danio rerio*-ban igazolták^{76,91}, azonban a reakció részvevőinek nagyfokú evolúciós konzerváltsága alapján feltételezhető, hogy a folyamat az állatvilág különböző szintjein azonos mechanizmussal mehet végbe.^{83,91} Azt azonban még nem

tudjuk, hogy a kollagén IV keresztkötési reakció kiesése a PXDN hiányában korábban megfigyelt számos fenotípusos eltérésnek mekkora részéért felelős, és hogy azokhoz más potenciális extracelluláris szubsztátok oxidációja és a fehérje által a mátrixban betöltött strukturális szerep milyen mértékben járulhat hozzá.



14. ábra: A kollagén IV NC1 domének közötti szulfilimin kötés kialakulása (¹⁶⁸ módosításával). A PXDN a kollagén IV NC1 doménben konzervált pozícióban elhelyezkedő metionin és lizin vagy hidroxilizin reziduumok között HOBr felhasználásával, egy bromoszulfónium-ion köztitermék kialakításával hozza létre az élő szervezetben egyedülálló szulfilimin kötést.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az állati hem-peroxidázok legújabbán azonosított képviselőjét, a PXDN-t az enzimes család többi tagjától eltérően széleskörű szöveti expresszió és az aktív peroxidáz domént az ECM fehérjék motívumaival kombináló harmadlagos szerkezet jellemzi. Több korábbi vizsgálat is alátámasztotta a PXDN meghatározó szerepét az ECM struktúrájának kialakításában, mégis igen kevés részletet tudunk azokról a molekuláris mechanizmusokról, amelyek a PXDN közreműködésével befolyásolják ennek a rendkívül összetett hálózatnak az integritását.

Doktori munkám az emlős PXDN fehérje különleges szerkezete és az általa betöltött funkciók közötti összefüggés jobb megértésére irányult. Ennek első megközelítéseként az irodalomban korábban leírt rendszereknél a fiziológiai körülményeket jobban megközelítő felállásban kívántam vizsgálni az endogén emlős PXDN és egyetlen ismert szubsztrátja, a kollagén IV közötti interakciót. A PXDN egyes régióinak jelentőségét a fehérje negyedleges szerkezetének kialakításában, illetve ismert működéseiben rekombináns PXDN konstrukciók segítségével végzett struktúra-funkció analízissel terveztük felderíteni. Vizsgálataink eredményei alapján a nagymértékben homológ PXDNL szerkezetével és működésével kapcsolatban is szeretnénk volna következtetéseket levonni.

A fent említett szempontoknak megfelelően kísérleteim kezdetén a következő célkitűzéseket tettem:

1. az endogén emlős PXDN kollagén IV keresztkötésben betöltött szerepének vizsgálata élő szövetből izolált primer sejtenyészeten,
2. az emlős PXDN negyedleges szerkezetének elemzése és az általa mutatott esetleges oligomerképzés mechanizmusának feltárása,
3. a PXDN ismert funkcióihoz, így peroxidázaktivitásához, szekréciónak és adhéziós szerepéhez köthető strukturális követelmények felderítése,
4. a PXDNL és a PXDN közötti szekvenciabeli hasonlóságok, valamint a PXDNL sejtszintű lokalizációjának vizsgálata.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Rekombináns humán PXDN és PXDNL konstruktok klónozása

A humán PXDN és PXDNL vizsgálatához a vad típusú fehérjéket kódoló plazmid DNS-ek mellett számos új, pontmutációkat és deléciókat hordozó, a jobb detektálhatóság érdekében V5-tag-gel is ellátott rekombináns fehérjekonstruktot terveztünk és klónoztunk meg, melyek elnevezését és sematikus szerkezetét a 15. ábra, a klónozásukhoz használt oligonukleotidok szekvenciáit pedig az 1. táblázat foglalja össze. Az egyszeres, kétszeres és háromszoros PXDN pontmutánsok elnevezése a bevitt aminosavcserek szekvenciabeli pozícióját, valamint az érintett aminosavak egybetűs rövidítéseit tartalmazza, amíg a trunkált konstruktok esetében az indexben tüntettük fel a kódolt régiónak a PXDN eredeti aminosavsorrendjében elfoglalt pozícióját.

A teljes hosszúságú humán PXDN-t és PXDNL-t kódoló konstruktt létrehozásához a cDNS-eket két korábban készített, pCMV-SPORT6 alapú plazmidből, adapter nélküli primerpárokkal erősítettük ki. Az így nyert inzerteket TA klónozással illesztettünk be a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba (Invitrogen). A pontmutációt hordozó PXDN konstruktokban a helyspecifikus nukleotidcsere a teljes hosszúságú szekvenciát kódoló vektorból kiindulva, célzott mutációkat tartalmazó, komplementer oligonukleotid párokkal végzett polimeráz láncreakcióban (PCR) hoztuk létre. A nem kívánt DNS hibák előfordulásának kizárása érdekében a tervezett módosítást tartalmazó régiókat megszekvenáltuk (Eurofins MWG Operon), majd azokat unikális hasítóhellyel rendelkező restriktions endonukleáz pár segítségével az eredeti vektorvázba klónoztuk. A doméneléció PXDN konstruktok esetében szintén TA klónozási stratégiát követve illesztettük a kívánt szekvenciárészletet kódoló nukleotidszakaszokat a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba. Munkacsoportunk egy korábban leírt rövid PXDN izoforma cDNS-ét kadmium-kloriddal stimulált EB1 vastagbél karcinóma sejtvonalból nyerte ki,⁷⁷ amit az N-terminálisan trunkált PXDN₆₉₅₋₁₄₇₉ konstruktt készítéséhez használtunk fel. A PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₇₉ klónozásához a humán PXDN első 26 aminosavából álló szignál szekvenciáját kódoló oligonukleotidokat hibridizáltattunk, majd azokat a PXDN₆₉₅₋₁₄₇₉ konstrukttban a start kodont közvetlenül követő unikális vágóhelyek közé ligáltuk. A C-terminálisan trunkált PXDN₁₋₁₄₁₂ konstruktt inzert régióját a teljes hosszúságú PXDN

szekvenciából amplifikáltuk a kiválasztott nukleotid régiót közrezáró PCR primerekkel. A PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₇₉ és a PXDN₁₋₁₄₁₂ megfelelő restrikciós fragmentjeinek összekapcsolásával készítettük el a PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₁₂ konstruktot. Minden plazmid esetében szekvenálással ellenőriztük, hogy a kódoló régiók nem tartalmaznak a DNS polimeráz által véletlenszerűen bevitt hibákat a PCR-rel felerősített szakaszokon.

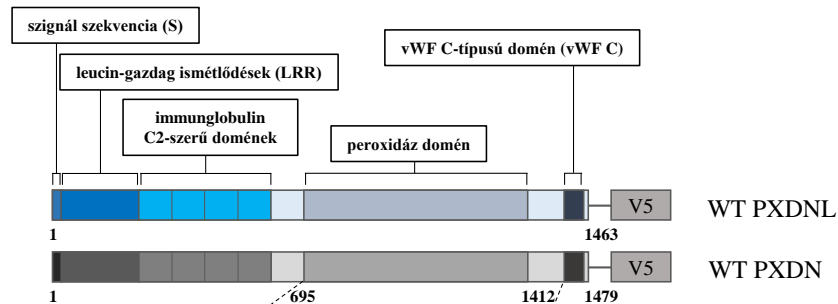
A rekombináns fehérjével végzett szerkezeti és funkcionális vizsgálatok mindegyikében üres pcDNA3.1/V5-His vektort alkalmaztunk transzfekciós kontrollként. A klónozások során a PCR reakciókat Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS polimeráz (Thermo Scientific) felhasználásával, a restrikciós fragmensek ligálását pedig T4 DNS ligáz (Thermo Scientific) segítségével végeztük. A konstruktok létrehozásához szükséges oligonukleotidokat a Sigma-Aldrichtól, az egyes klónozási lépésekben és a diagnosztikus emésztéseknél alkalmazott restrikciós endonukleázokat pedig a Fermentastól rendeltük.

5.2. PXDN-hiányos egértörzs készítése és tenyésztése

Annak érdekében, hogy a PXDN genetikai szintű hiányának hatásait emlős szervezetben vizsgálhassuk, laborunk megrendelésére a SAGE Laboratories cink-ujjas endonukleáz (ZFN) technológia alkalmazásával PXDN knockout C57BL/6 egértörzset hozott létre. A knockout egerek komplex fenotípusának elemzése jelen dolgozat anyagának nem képezi részét, azonban a tenyészet állatai embrionális eredetű primer fibroblasztok (MEF) forrásaként alapvető jelentőségű eszközei voltak kísérleteinknek, melyeket a XIV-I-001/2140-4/2012 számú állatkísérletes engedély birtokában végeztünk el. Munkánkhoz heterozigóta tenyészpárokat válogattunk össze, mert kizárólag ebben a felállásban van lehetőség vad típusú és knockout testvérpár utódok egyidejű kialakulására. Az időzített pároztatás után 13 nappal a vemhes nőstényeket nyaki diszlokációval termináltuk. A terhes méh kimetszését követően az embriókat egyesével dolgoztuk fel, feji részüket genotipizálásra, a testfalukat pedig MEF sejtek izolálására különítettük el. A két genotípus jellemzőit összehasonlító kísérletekhez minden esetben testvérpárokból származó sejteket használtunk fel.

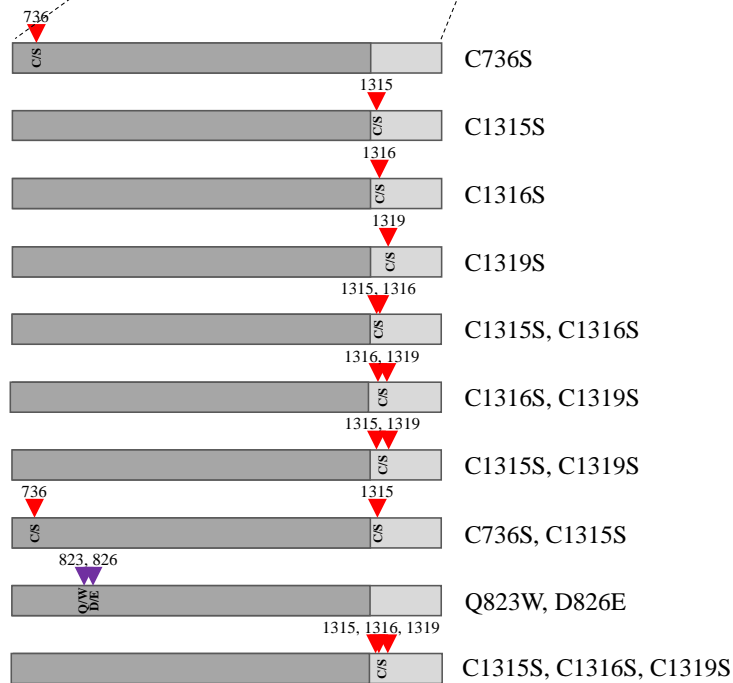
A

Teljes hosszúságú, vad típusú PXDN és PXDNL konstruktok



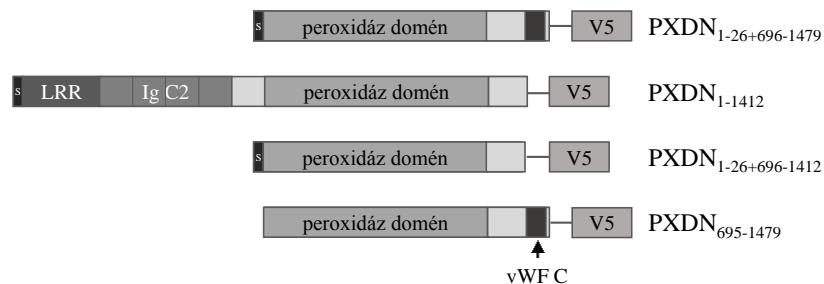
B

Teljes hosszúságú pontmutáns PXDN konstruktok



C

Doméneléziós PXDN konstruktok



15. ábra A kísérleteinkhez használt rekombináns PXDN és PXDNL konstruktok sematikus szerkezete. A teljes hosszúságú, vad típusú fehérjék mellett (A) több, pontmutációkat hordozó (B) és trunkálós (C) PXDN konstruktot is elkészítettünk.

1. táblázat: A rekombináns PXDN és PXDNL konstruktok klónozásához használt oligonukleotidok szekvenciái

| Primer szekvenciája | | Primer neve |
|--|--|----------------------------------|
| TA klónozási primerek: | | |
| ACCATGGCCAAGCGCTCCAGG | | f.l. PXDN szenz |
| GGGCTTTCTCCGCCCTCTCTG | | f.l. PXDN antiszenz |
| GGTACTGAGCCGTGATTC AAGTTTCTT | | PXDN ₁₋₁₄₁₂ antiszenz |
| ACCATGGAGCCAGACTGTTCTGCTG | | f.l. PXDNL szenz |
| GCGCTTCTTGGGGAATCACTTGG | | f.l. PXDNL antiszenz |
| Mutagenézis primerek: | | |
| CAACTGCTGGACATGAGCTTCCACCAGAAAGTAC | | C736S szenz |
| GTACTTCTGGTGAAGCTCATGTCCGAGCAGTTG | | C736S antiszenz |
| ACCTCCGGGTGGCAGGACTCTGTGAAGACTGTAGGACCAG | | C1315S szenz |
| CTGGTCTACAGTCTTACAGGAGTCTGCCACACCCGGAGGT | | C1315S antiszenz |
| CGGGTGGCAGGACTGCTTGAAGACTGTAGGACCAGG | | C1316S szenz |
| CCTGGTCTACAGTCTTACAGAGCAGTCTGCCACACCCG | | C1316S antiszenz |
| GCAGGACTGTGTGAAGACTTAGGACCAGGGGGCAGTTCA | | C1319S szenz |
| TGAAC TGCCCTGTCTAGAGTCTTACAGCAGTCTCTGC | | C1319S antiszenz |
| CGGGTGGCAGGACAGCAGTGAAGACTGTAGGACCAGG | | C1315S, C1316S szenz |
| CCTGGTCTACAGTCTTACAGTCTGCTGCCACACCCG | | C1315S, C1316S antiszenz |
| GTGTGGCAGGACTGCTGTGAAGACAGTAGGACCAGGGGGC | | C1316S, C1319S szenz |
| GCCCCGTGCTACTGTCTTACAGAGCAGTCTGCCACAC | | C1316S, C1319S antiszenz |
| GGTGTGGCAGGACTCTGTGAAGACAGTAGGACCAGGGGG | | C1315S, C1319S szenz |
| CCCCCTGTCTACTGTCTTACAGGAGTCTGCCACACC | | C1315S, C1319S antiszenz |
| CGGGTGTGGCAGGACAGCAGTGAAGACAGTAGGACCAGGGGGC | | C1315S, C1316S, C1319S szenz |
| GCCCCGTGCTACTGTCTTACAGTCTGCTGCCACACCCG | | C1315S, C1316S, C1319S antiszenz |
| Hibridizáltatott oligonukleotidok: | | |
| TTACCATTGCCAAGCGTCCAGGGGGCCCCGGCGCTGTGTGGCGCTGTGTGCGCCCTGGGGGACGCTGGCCGTCGACCTC | | szignál szekvencia szenz |
| GAGGTCGACGGCCAGCGTCCCCCAGGCGCAGAACAGCAGAGCGCCACAGGACGCGGCCCGCCCTGGAGCGCTTGGCCATGGTAA | | szignál szekvencia antiszenz |

5.3. Sejtenyésztés és sejt kultúrán végzett kísérletek

A kísérleteinkben használt HEK293 freestyle (FS; Invitrogen) és Cos7 sejteket (ATCC) 10% magzati borjúszérummal (FBS; Lonza) és 100 U/ml penicillin és 100 ng/ml sztreptomycin (Lonza) keverékével kiegészített Dulbecco-féle módosított Eagle médiumban (DMEM; Lonza) tenyésztettük. A sejtek tranziens transzfekcióját Lipofectamine LTX és Plus reagensek (Invitrogen) felhasználásával, a gyártó által megadott protokoll szerint végeztük. A V5-tag-gel ellátott humán PXDN-t konstitutívan expresszáló, stabil sejt vonal létrehozásához HEK293FS sejteket transzfektáltunk a neomicin rezisztenciagént is tartalmazó pcDNA3.1/hsPXDN-V5-His (WT) konstrukttal. A stabilan transzfektált sejtek szelekciójának céljából 48 órával a transzfekciót követően 1000 ng/ml geneticinnel (G418-szulfát; Gibco) egészítettük ki a médiumot, majd további 6 héten keresztül tartottuk fenn a szelekciós nyomást. A túlélő sejtek izolálását követően az egyes sejtklónok PXDN tartalmát Western blot kísérletekben hasonlítottuk össze. A legmagasabb expressziót mutató klónokat kiterjesztettük és 400 ng/ml geneticin jelenlétében tenyésztettük tovább, később pedig a rekombináns fehérje tisztítására használtuk fel.

Az endogén humán PXDN funkciójának és szupramolekuláris szerkezetének tanulmányozására választott humán umbilikális véna endotél sejteket (HUVEC; Lonza) EGM-2 médiumban (Lonza) tartottuk fenn. Az endogén PXDN enzimaktivitásának farmakológiai gátlására phloroglucinol (Sigma-Aldrich) általános peroxidázinhibitor alkalmaztunk, amit a bemutatott kísérletben 48 órán keresztül, 50 µg/ml végkoncentrációban adtunk a sejtekhez.

Az egér embrionális fibroblasztok (MEF) izolálásához vad típusú (WT) és PXDN-hiányos (KO) embriókat használtunk fel. A fej és a fejlődő zsigereknek megfelelő vörös szövetek eltávolítását követően a megmaradt testfalat steril pengével apró darabokra vágtuk, majd kétszer 10 percig 37 °C-on inkubáltuk 5 ml 1x tripszin-EDTA oldatban (Lonza). A meg nem emésztett, nagyobb méretű szövetdarabok ülepedését követően a felülúszót 40 ml DMEM-alapú médiumhoz adtuk, amely 10% FBS-t, 100 U/ml penicillin és 100 ng/ml sztreptomycin keveréket, 1xMEM nem-esszenciális aminosav oldatot (NEAA; Sigma-Aldrich), 1x MEM vitamin oldatot (Sigma-Aldrich) és 50 ng/ml nátrium-aszorbátot (Sigma-Aldrich) tartalmazott. A sejteket 377 g-vel centrifugáltuk 5 percig,

majd az üledéket friss médiumban szuszpendáltuk és steril flaskába helyeztük. Első passzázukat követően a sejteket 90%-os konfluenciáig növesztettük, majd hosszútávú felhasználás céljára több adagra osztva fagyasztottuk le őket. A MEF sejteket igénylő kísérletekhez egységesen újonnan felolvasztott P1 sejtekből kiinduló tenyészetet használtunk. A PXDN-deficiens MEF sejtekbe Neon transzfekciós rendszer segítségével végzett elektroporációval (1350 mV, 30 ms, 1 ütés) juttattuk be a vizsgálni kívánt rekombináns PXDN konstruktokat.

A felhasznált sejtvonalak és primer sejtek mindegyikét párásított, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában tenyésztettük a 37 ° C-os inkubátorban.

5.4. Primer antitestek

Mivel a kereskedelmi forgalomban elérhető, PXDN-specifikus ellenanyagok tapasztalataink alapján nem bizonyultak kellően megbízhatónak a fehérje kimutatására, munkacsoportunk több megközelítést is sikerrel alkalmazott PXDN-t felismerő ellenanyagok készítésére. Ezeket a reagenseket és a kísérleteinkben felhasznált gyári ellenanyagokat a következőkben külön mutatom be.

5.4.1. Kereskedelmi forgalomban kapható antitestek

Az epitóppal jelölt rekombináns PXDN és PXDNL konstruktok kimutatására használt monoklonális V5-specifikus ellenanyagot az AbD Serotec-től szereztük be. A Western blot kísérletekben összehasonlított minták egyenletes fehérjetartalmának igazolására a Sigma-Aldrichtől vásárolt monoklonális, β -aktint felismerő antitestet alkalmaztuk töltéskontrollként. Az eltérő kollagén IV izoformák expressziójának és keresztkötöttségének vizsgálatára használt, azok NC1 doménjeit felismerő patkány monoklonális ellenanyagokat a Chondrex Inc.-től rendeltük.

5.4.2. Saját fejlesztésű PXDN-specifikus antitestek

Laborunk korábbi munkájához kollégáim bakteriális expressziós rendszerben termeltetett, a humán és egér PXDN utolsó 150 aminosavát tartalmazó GST-fúziós

fehérjekonstruktokat (hsPXDN₁₃₂₉₋₁₄₇₉, mmPXDN₁₃₂₆₋₁₄₇₅) készítették, a tisztított antigént pedig nyulak intrakután oltásaihoz felhasználva hiperimmun szérumot állítottak elő. Az így nyert reagensek használata során kapott háttér csökkentése érdekében a szérumból a GST ellen termelt antitesteket a fehérjét hordozó protein G agaróz gyönggyel (Invitrogen) depletáltuk, majd a PXDN-t felismerő poliklonális antitestfrakciót az immunizáláshoz használt peptidekkel konjugált Affigel 10 (Bio-Rad) segítségével tisztítottuk. Az α -mmPXDN-nel kapott jel specificitását knockout kontrollal szemben igazoltuk Western blotban, amíg a α -hsPXDN validálása során nyert eredményeket munkacsoportunk már bemutatta korábbi publikációjában.⁸⁰

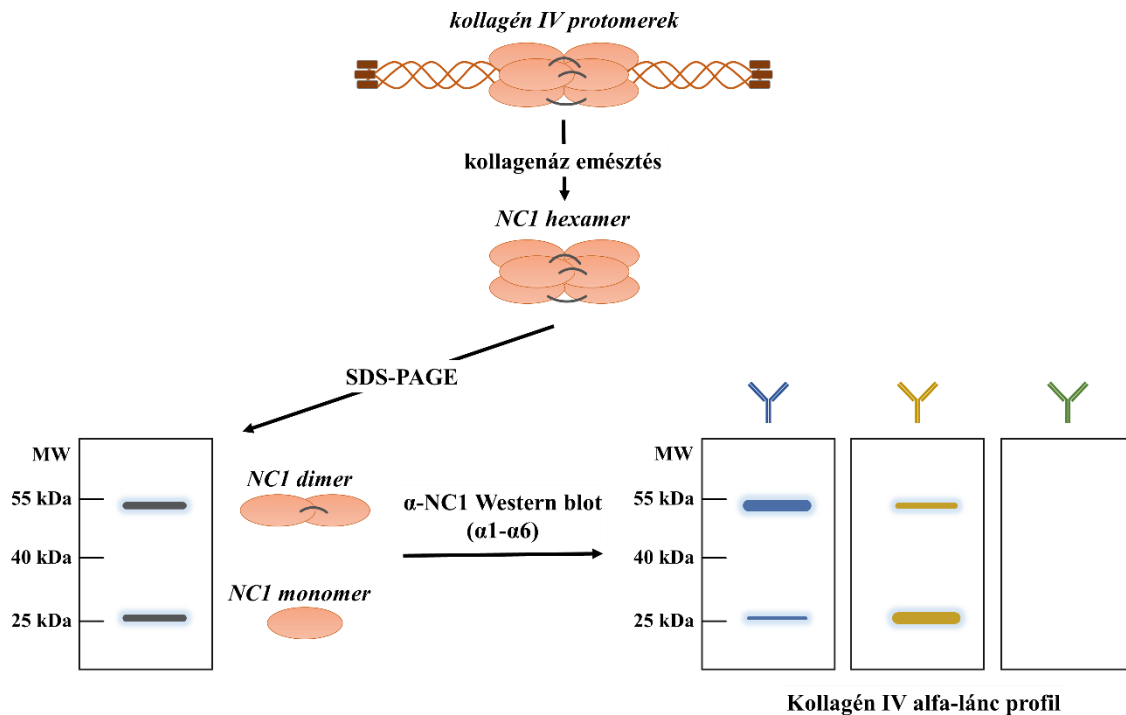
5.5. A PXDN oligomerizációjának vizsgálata

A HUVEC, MEF, valamint a rekombináns PXDN konstruktokat expresszáló HEK293FS sejteket 10 percig szobahőn inkubáltuk 1 mM N-etilmaleimid (NEM; Sigma-Aldrich) tiol-alkiláló reagenst tartalmazó 300 mM HEPES (4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-etánszulfonsav) pufferben (pH 7,4), majd proteázinhibitorokkal (10 μ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich), 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF; Sigma-Aldrich), cOmplete Mini EDTA-mentes proteázinhibitor koktél tabletták (Roche)) és 1 mM NEM-del kiegészített RIPA pufferben (0,5% nátrium-deoxikolat (DOC; USB Corporation), 0,1% nátrium-dodecilszulfát (SDS; Affymetrix), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0) tártuk fel őket. A detergenssek által fel nem oldott frakció elkülönítésének céljából a sejtízátumokat 10 percig 16100 g-vel centrifugáltuk. A felülúszókhöz 4x Laemmli mintapuffert (0,02% brómfenolkék, 8% SDS, 40% glicerin, 250 mM Tris, pH 6,8) adtunk 0,5% végkoncentrációjú β -merkaptoetanol (β ME; Sigma-Aldrich) jelenlétében vagy anélkül, a redukált mintákat pedig 8 percen át 96 °C-on forraltuk. A nem redukált lizátumokat 4 vagy 5%-os poliakrilamid (Bio-Rad)-SDS gélen választottuk szét ProSieve QuadColor fehérjemarker (4.6-300 kDa; Lonza) és HiMark festett protein standard (Novex) mellett. Az endogén és rekombináns PXDN oligomerizációját Western blotban, a monomer, dimer és trimer formák magasságában megjelenő PXDN- vagy V5-pecifikus jel alapján értékeltük. A különböző konstruktok transzfekciós hatékonyságát a redukált mintákból készült Western blotban, V5-specifikus antitesttel kapott jel alapján hasonlítottuk össze.

5.6. A kollagén IV profil és NC1 keresztkötés vizsgálata

Az endogén emlős PXDN kollagén IV keresztkötő aktivitását HUVEC sejtek, valamint vad típusú és PXDN knockout egér embrionális fibroblasztok segítségével teszteltük. A HUVEC phloroglucinollal történő kezelését követően 48 órával, a MEF esetében pedig a sejtek leosztását követően négy nappal vizsgáltuk a kifejeződő kollagén IV izoformákat és azok NC1 doménjeinek keresztkötöttségi állapotát. A sejteket 300 mM HEPES pufferrel (pH 7,4) mostuk meg, majd 0,1 mM benzamidin-hidrokloriddal, 1 mM PMSF-dal és 1 mM NEM-del kiegészített hipotóniás lízispufferben (10 mM CaCl₂, 50 mM HEPES, pH 7,4) vettük fel őket. A sejtízátum egy részét 4x redukáló Laemmli puffer hozzáadását követően 8 percig 96 °C-on főztük, majd az így nyert mintákból készült Western blotban α -mmPXDN ellenanyag segítségével ellenőriztük a sejtek fenotípusát. A lízátum másik részét 0,5 mg/ml I. típusú kollagenázzal (Worthington) inkubáltuk 37 °C-on 24 órán át. A kollagenázzal emésztett mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével választottuk szét, majd blottolást követően a keresztkötött dimer és monomer NC1 doméneket specifikus antitestekkel, 55 és 25 kDa környéki magasságokban mutattuk ki. A hat különböző kollagén IV izoformát felismerő ellenanyaggal kapott eredmény alapján határoztuk meg a vizsgált sejtípusra jellemző kollagén IV profilt. A kísérleti protokoll főbb lépéseit a *16. ábra* foglalja össze.

Az NC1 domének keresztkötöttségi állapotát technikai megfontolások alapján a dolgozatban és az annak alapjául szolgáló közleményben is csak az α 2-izoformára specifikus antitesttel előhívott Western blotokon mutattuk be. Ennek elsősorban az volt az oka, hogy a többi kollagén IV lánc felismerésére alkalmas monoklonális antitestek a dimer és monomer NC1 doménekkal szemben több esetben is jelentősen eltérő affinitást mutattak, így azok arányában kialakuló eltérések szemléltetésére nem, vagy csak kevésbé bizonyultak alkalmasnak, és további, a dolgozat anyagához szorosan nem kapcsolódó kísérleteket tettek szükségessé a velük kapott eredmények validálására.



16. ábra: A kollagén IV profil és NC1 kereszt kötési vizsgálat menete

A rekombináns PXDN konstruktok kollagén IV kereszt kötő képességének vizsgálatára PXDN-deficiens MEF sejtek felhasználásával funkciómentő („rescue”) kísérleteket végeztünk. A tranziensen transzfektált sejtekből 24 óra elteltével teljes sejtlizátumot készítettünk, amit a különböző rekombináns fehérjék expressziójának Western blotban történő összehasonlítására használtunk fel. Az azonosan kezelt, párhuzamos minták kollagenáz emésztését csak 72 óra elteltével kezdtük meg, hogy elég időt biztosítsunk a kollagén IV molekulák szekréciójára és kereszt kötésének katalízisére. A szulfiliminkötések létrejöttét ebben az esetben is az $\alpha 2$ IV kollagén izoformát felismerő antitest segítségével, a dimer NC1 doménnek megfelelő magasságban kapott jel alapján mutattuk ki a kollagenázzal kezelt mintákban.

5.7. A PXDN szekréciójának vizsgálata

A rekombináns PXDN konstruktok szekréciójának vizsgálatához Cos7 sejteket osztottunk le egy 12-lyukú plate-re, majd közvetlenül a letapadásukat követően a sejteket tranziensen transzfektáltuk a vizsgálni kívánt fehérjét kódoló plazmidokkal. 12 órával később a DMEM alapú sejt kultúra médiumot fehérjementes Freestyle 293 expressziós

médiumra (Gibco) cseréltük. Újabb 24 óra elteltével a felülúszókat begyűjtöttük, a sejtekből pedig tejes sejt-lizátumot készítettünk. A médiumból az esetlegesen jelenlévő sejt-törmelékeket 10 perces, 800 g-vel történő centrifugálással távolítottuk el, majd 4x Laemmli puffer hozzáadása után 8 percig 96 °C-on forraltuk a mintákat. A sejteket 300 mM HEPES pufferrel (pH 7,4) történt mosást követően 4x Laemmli pufferben kapartuk fel, majd a médiumnál leírtaknak megfelelően hőkezeltük a lizátumokat. A minták SDS-PAGE-sel történő szétválasztását követően azok PXDN tartalmát Western blotban, a V5-specifikus antitesttel kapott jel alapján hasonlítottuk össze. A sejt-lizátumok esetében a felvitt minták egyenletes fehérjetartalmát, a médiumból származó mintákban pedig a sejtes szennyeződés hiányát az aktintartalom vizsgálatával igazoltuk.

5.8. Western blot és immunprecipitáció

A redukált és nem redukált fehérjeminták gélelektroforézisét követően a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Amersham Protran) blottoltuk. A felhasznált antitestek aspecifikus kötődésének csökkentése érdekében a membránt 0,1% Tween-t (Sigma-Aldrich) és 5% tejport vagy 5% borjúsérumból származó albumint (BSA, Affymetrix) tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk. A felhasználni kívánt elsődleges antitestet előzetesen optimalizált arányban hígítottuk az előző lépésben használt oldatok valamelyikében. Az antitesttel történő inkubációt követően 0,1% Tween-PBS oldattal végzett intenzív mosásokkal távolítottuk el az oldatban maradt vagy aspecifikusan kötődő antitestfrakciót. Ezután tormaperoxidázzal (HRP) konjugált egér, nyúl vagy patkány immunglobulin elleni reagenst (Advansta) használtunk a membránhoz kötődő elsődleges antitestek kimutatására, majd az antitestfelesleget 0,1% Tween-PBS segítségével mostuk el. A célfehérjéket indirekt módon, a Westernbright ECL kitben (Advansta) található luminol szubsztrát tormaperoxidáz által katalizált oxidációja során keletkező kemilumineszcens jel segítségével jelenítettük meg.

A rekombináns humán PXDN-t tartalmazó fehérjekomplexek izolálása céljából a PXDN-V5-öt stabilan expresszáló HEK293FS sejtek lizátumát anti-V5 agaróz affinitás-géllal (Sigma-Aldrich) inkubáltuk 1 mM NEM jelenlétében. Az inkubációt követően a gyöngyöket többször mostuk RIPA pufferrel, majd a megkötött fehérjéket 1 µg/ml V5-His peptidet (Caslo) tartalmazó vizes oldattal eluáltuk. Nem redukáló Laemmli puffer

hozzáadását követően a precipitátum alkotóit 4%-os poliakrilamid-SDS gélen választottuk szét, amit ezt követően Coomassie kék (0,1% brilliantkék G (Sigma-Aldrich), 25% metanol, 5% ecetsav) vagy Acqua Stain oldattal (Acqua Science Ltd.) festettünk meg. Az intenzív jelet adó fehérjesávokat kimetszettük a gélből, majd összetevőik meghatározása céljából tömegspektrometriai vizsgálatra küldtük ki őket.

Az endogénean expresszálódó PXDN-t HUVEC sejtek lizátumából (1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, cOmplete Mini EDTA-mentes proteázinhibitor koktél tabletták, 140 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 7,4) nyertük ki. A PXDN-tartalmú fehérjekomplexeket a tisztított poliklonális α -hsPXDN ellenanyag segítségével precipitáltuk, amit aztán protein G agaróz gyöngy segítségével kötöttünk meg. Többszöri mosást (0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 140 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 7,4) követően a tisztított fehérjéket nem redukáló 4x Laemmli pufferrel eluáltuk, majd 4%-os poliakrilamid-SDS gélen futtattuk meg. A megfestett fehérjesávokat kivágtuk és tömegspektrometriai elemzésnek vetettük alá.

5.9. Tömegspektrometriai analízis

Az immunprecipitációk során izolált PXDN-tartalmú fehérjekomplexek tömegspektrometriai analízisét az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Proteomikai Kutatócsoportjában dolgozó együttműködő partnereink, Dr. Klement Éva és Dr. Medzihradzky Katalin végezték.

A fehérjemintákat tartalmazó géldarabokat a laborban rutinszerűen alkalmazott protokoll szerint kezelték módosított oldalláncú sertés tripszinnel (Promega), majd az emésztés során nyert peptideket nanoACQUITY UPLC rendszerrel (Waters) sorosan kapcsolt LCQ-Fleet 3D Ion Trap vagy LTQ-Orbitrap Elite tömegspektrométer (Thermo Scientific) segítségével analizálták. A legnagyobb mennyiségben megjelenő többszörösen töltött ionokat MS/MS felállásban is vizsgálták. A 3D Ion Trap adatokat Mascot Distiller (2.1.1.0. verzió), az LTQ-Orbitrap adatokat pedig PAVA (2010.09.30. verzió) szoftverrel elemezték. A fehérjekeresést az NCBI 2011.06.10-i nem redundáns protein adatbázisának humán szekvenciáival (182800/14324397 szekvencia) szemben végezték a rendelkezésre álló Mascot szerver (2.2.04. verzió) segítségével. A keresés során a 3D Ion Trap adatok esetében 70,6 kDa-os prekursor és 71 kDa-os fragmens

toleranciát, az LTQ-Orbitrap adatoknál pedig 10 ppm prekursor és 0,6 Da-os fragmens toleranciát állítottak be, valamint két kihagyott tripszin hasítóhelyet engedélyeztek. A ciszteinek karbamidometil-csoporttal történő módosítását fix, a protein N-terminálisának acetilációját, a metionin oxidációját, illetve az N-terminális glutamin piroglutamáttá alakulását lehetséges modifikációként adták meg. A keresés során a $p < 0,05$ -tel jellemezhető peptidtalálatokat fogadták el.

5.10. Immunfluoreszcens jelölések és konfokális mikroszkópia

A rekombináns PXDNL-t és különböző rekombináns PXDN konstruktokat expresszáló Cos7 és PXDN-deficiens MEF sejteket a transzfekciót követő 48 órán keresztül növesztettük fedőlemezen. A médium leszívása után PBS-sel mostuk, majd 20 percen keresztül 4%-os paraformaldehid (PFA; Sigma-Aldrich)-PBS oldatban fixáltuk a sejteket. A kereszkötő reagens eltávolítását követően PBS-sel és 100 mM glicin (Affymetrix)-PBS oldattal mostuk el a PFA maradványait. A fedőlemezek egy részét 0,1% Triton X-100-szal kiegészített 1% BSA-PBS oldatban permeabilizáltuk 20 percen keresztül, más minták esetében pedig elhagytuk az oldatból a detergenst, amivel lehetővé tettük az intra- és extracellulárisan megjelenő festődési jelek közötti különbségtételt. Az antitestek aspecifikus kötődésének mértékét 1 órán át 3% BSA-PBS oldatban történő blokkolással csökkentettük, amit az 1% BSA-PBS-ben hígított elsődleges antitestekkel történő 1 órás inkubáció követett. A rekombináns konstruktok lokalizációjának kimutatására α -hsPXDN és α -V5 ellenanyagokat használtunk. Az inkubációs idő lejártával a felesleges antitesteket többszöri, PBS-sel történő mosással távolítottuk el, majd Alexa Fluor 488 vagy 568 anti-nyúl és anti-egér IgG-t (Thermo Scientific) tartalmazó 1% BSA-PBS oldatban inkubáltuk a sejteket további 1 órán keresztül. A végső mosásokat követően a fedőlemezeket polivinil-alkoholból (Sigma-Aldrich), glicerinnél, vízből és Tris pufferből (pH 8,5) készített Mowiol 4-88 reagenssel fedtük le.

Az immunfestett sejteket LSM 710 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss), 63x nagyítású, 1,4 numerikus apertúrájú Plan-Apochromat objektív (Carl Zeiss) segítségével vizsgáltuk. A dolgozatban a z-tengely mentén a minták teljes mélységére kiterjedő optikai szelektálással kapott, 0,5 μ m-es rétegekből származó felvételek maximális intenzitás projekció (MIP) alkalmazással integrált képei szerepelnek. A

specifikus festődést nem mutató látóterekben álszínes LUT (lookup table) megjelenítéssel igazoltuk a letapadt sejtek jelenlétét.

5.11. Peroxidázaktivitás mérése

A rekombináns PXDN konstruktok *in vitro* peroxidázaktivitását tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumának Amplex Red Peroxidase Assay-ben (Molecular Probes) történő mérésével hasonlítottuk össze. A 12-lyukú plate-re osztott sejtekről 24 órával a transzfekciót követően eltávolítottuk a médiumot, majd PBS-sel történő mosás után 1%-os hexadecil-trimetil-ammónium-bromidot (CTAB; Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS oldattal lizáltuk őket. A gyártó által a megadott instrukcióknak megfelelően a sejtlyizátum és a 100 μ m Amplex Red reagenst és 2 mM H₂O₂-ot tartalmazó reakciópuffer 50-50 μ l-ét kevertük össze a 96-lyukú plate egy welljében, majd a 30 perc hosszú, szobahőmérsékleten töltött inkubációs idő végén a reakció végtermékeként keletkező rezorufin 590 nm-en mutatott fluoreszcenciáját POLARstar OPTIMA 96-lyukú microplate olvasóval (BMG LABTECH) detektáltuk. Az adott mintához tartozó értéket minden esetben három technikai párhuzamos átlagaként határoztuk meg a sejtlyizátum üres reakciópufferrel alkotott keverékével kapott háttérérték levonását követően.

5.12. Többszörös aminosavszekvencia-illesztés

A humán hem-peroxidáz család tagjainak, illetve a különböző fajokból származó PXDN szekvenciáinak, valamint a humán PXDN és PXDNL aminosavsorrendjének összehasonlításához az említett fehérjék többszörös szekvenciaillesztését a Clustal Omega szoftver segítségével végeztük el.¹⁶⁹ A programmal vizsgált proteinekhez tartozó UniProt azonosítószámokat a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: A többszörös szekvenciaillesztéssel összehasonlított fehérjék UniProt azonosítószámai

| Fehérje neve | Rövidítés | Organizmus | UniProt azonosítószám |
|---------------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------|
| Mieloperoxidáz | MPO | <i>Homo sapiens</i> | P05164 |
| Eozinofil peroxidáz | EPX | <i>Homo sapiens</i> | P11678 |
| Laktoperoxidáz | LPO | <i>Homo sapiens</i> | P22079 |
| Tireoperoxidáz | TPO | <i>Homo sapiens</i> | P07202 |
| Peroxidazin-szerű fehérje | PXDNL | <i>Homo sapiens</i> | A1KZ92 |
| Peroxidazin | PXDN | <i>Homo sapiens</i> | P92626 |
| Peroxidazin | PXDN | <i>Mus musculus</i> | Q3UQ28 |
| Peroxidazin | PXDN | <i>Xenopus tropicalis</i> | A4IGL7 |
| Peroxidazin | PXDN | <i>Drosophila melanogaster</i> | Q9VZZ4 |
| Peroxidazin-1 | PXN-1 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Q1ENI8 |
| Peroxidazin-2 | PXN-2 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | G8EG78 |

5.13. Statisztikai analízis

A dolgozatban szereplő reprezentatív Western blotok és immunfluoreszcens képek mindegyike legalább három független kísérlet egybehangzó eredményét demonstrálja. Az Amplex Red peroxidáz mérésben kapott adatokat a rezorufin fluoreszcencia hat független mérésben kapott értékének átlagaként mutattuk be, az átlag standard hibájának (\pm s.e.m.) feltüntetésével. Az eredmények statisztikai értékeléséhez a GraphPad PRISM 5 szoftver segítségével egyutas ANOVA próbát használtunk. Ezután Sidak-féle post-hoc tesztekkel hasonlítottuk össze az egyes konstruktok enzimaktivitását a kontroll és a vad típusú fehérjét expresszáló mintákkal. Az eredményeket $p < 0,05$ esetében tekintettük szignifikánsnak.

6. EREDMÉNYEK

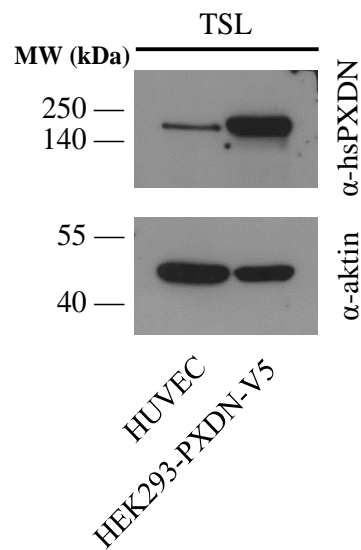
6.1. Az endogén emlős PXDN szerepének vizsgálata a bazális membránok kollagén IV hálózatának szintézisében

Az ubikviter előfordulású PXDN ECM-szintézisben betöltött egyedi és egyben általános jelentőségű szerepét több korábbi vizsgálat is valószínűsítette, mégis csak a közelmúltban sikerült azonosítani az első olyan, PXDN részvételével zajló biokémiai reakciót, amely az előzetes megfigyelések magyarázatául szolgálhat.⁴⁴ Az ECM specializált formáját jelentő bazális membránok legnagyobb mennyiségben jelenlévő alkotója a kollagén IV fehérje, amely kétdimenziós struktúrába szerveződve mechanikai stabilitást biztosít és információkat közvetít az extracelluláris térből a hozzá kapcsolódó sejtek számára. A nemrégiben megismert, PXDN által katalizált folyamatban H₂O₂ és Br⁻ jelenlétében kovalens szulfiliminkötés létesül két, egymással szemben fekvő kollagén IV alegység nem kollagenózus (NC1) doménjei között, ami alapvető jelentőséggel bír a hálózat szerkezetének kialakításában. Ezt az eredményt elsősorban olyan *in vitro* kísérleti adatok támasztják alá, amelyek a PFHR-9 embrionális karcinóma sejtvonal peroxidázinhibitorokkal történő farmakológiai gátlásán, illetve heterológ expressziós rendszerben kifejezett, rekombináns humán PXDN biokémiai analízisén alapulnak.⁴⁴ A fenti folyamat élettani jelentősége *Drosophila melanogaster*ben⁴⁴ és *Danio rerio*ban is igazolást nyert *in vivo*,⁹¹ emlős adatok azonban ezidáig nem álltak a rendelkezésünkre. Annak tisztázására, hogy a kollagén IV protomerek keresztkötésének fiziológiás útvonalát emlősökben is a PXDN által katalizált reakció jelenti-e, humán és egér szervezetből nyert primer sejtenyészeteket használtunk fel.

6.1.1. A PXDN részvételének elemzése HUVEC sejtek kollagén IV keresztkötésében

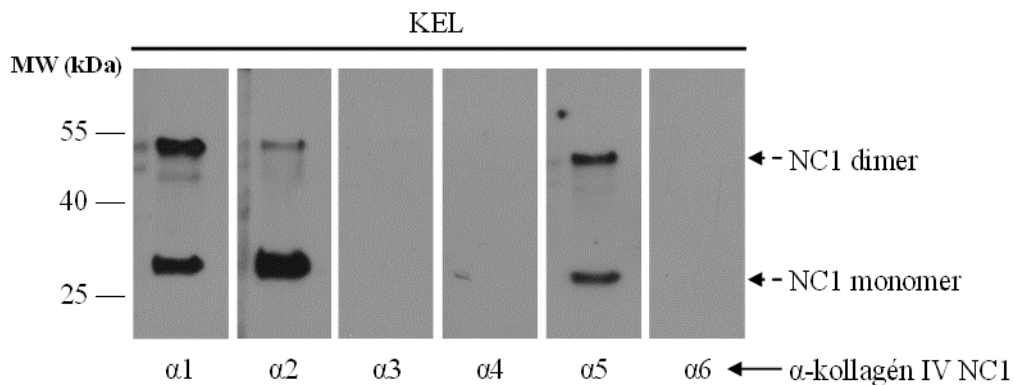
Az endogén humán PXDN kollagén IV keresztkötő képességének vizsgálatára köldökzsinórvénából izolált endotél sejteket (HUVEC) használtunk fel. A HUVEC sejtek intenzív osztódási képességet mutatnak és már néhány nap alatt jelentős mennyiségű ECM fehérje szintézisére és szekréciójára képesek. Először Western blottal mutattuk ki a HUVEC sejtekben endogénean megjelenő PXDN fehérjét, amihez munkacsoportunk által

fejlesztett és tisztított, a fehérje C-terminális fragmensét felismerő poliklonális nyúl ellenanyagot használtunk fel. A HUVEC sejtekben detektált PXDN-specifikus jelet saját készítésű, a rekombináns humán PXDN-t nagy mennyiségben kifejező stabil HEK293FS sejtvonalban kapott csíkhöz hasonlítottuk. A töltéskontrollként használt aktin azonos mennyisége mellett az endogén PXDN a túlexpresszált fehérjéhez képest jelentősen kisebb, de még összevethető intenzitással jelent meg 165 kDa-os molekulatömegének megfelelő magasságban (17. ábra).

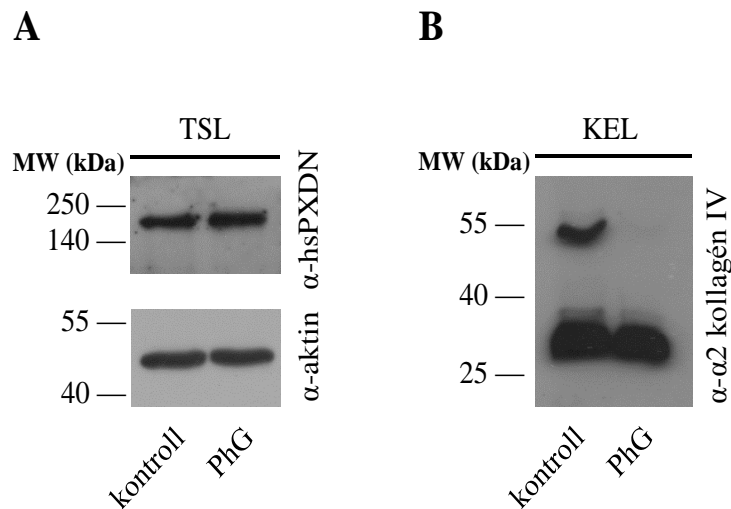


17. ábra: HUVEC és PXDN-V5-öt expresszáló stabil HEK293 klón PXDN expressziójának összehasonlítása. A primer endotél sejtenyészetben detektált PXDN jelnek megfelelően a heterológ módon kifejezett rekombináns fehérje is 165 kDa-os magasságban, azonban az endogén PXDN-nél jelentősen erősebb intenzitással jelent meg a teljes sejtlizátumokból (TSL) készült Western bloton.

Annak meghatározására, hogy a hat ismert kollagén IV izoforma közül melyek jelennek meg a HUVEC sejtek által termelt ECM-ben, a sejtenyészet hipotóniás pufferben felvett lizátumát kollagenáz enzimmal emésztettük. Az így kezelt mintákból készült Western blotban a kollagén IV-ből felszabadult NC1 doméneket izoformaszpecifikus antitestek segítségével mutattuk ki. Ezekben a kísérletekben a különböző α -láncok jelenlétén vagy hiányán túl azok kereszt kötöttségi állapotáról is információhoz jutottunk, mivel a monomer és dimer NC1 domének jól elkülönülő, 25 és 55 kDa környéki molekulatömegeknél adtak jelet. Eredményeink alapján a HUVEC sejtek a kollagén IV $\alpha 1$ és $\alpha 2$ izoformáját nagy, az $\alpha 5$ láncot pedig kisebb mennyiségben fejezik ki, $\alpha 3$, $\alpha 4$ és $\alpha 6$ NC1 doméneket pedig nem tudtunk kimutatni (18. ábra).



18. ábra: A HUVEC sejtek által termelt kollagén IV láncok izoformák szerinti megoszlásának és kovalens keresztkötöttségének vizsgálata. A sejtek kollagenázzal emésztett lizátumának (KEL) Western blot analízise során az egyes izoformákra specifikus antitestekkel detektáltuk a HUVEC sejtekben kifejeződő kollagén IV profilt. A 25 és 55 kDa környékén megjelenő szignálok alapján az $\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\alpha 5$ láncok NC1 doménjeit kovalensen keresztkötött dimer és monomer formában is ki tudtuk mutatni, az $\alpha 3$, $\alpha 4$ és $\alpha 6$ láncra jellemző emésztési termékek azonban nem voltak jelen a mintában.



19. ábra: Phloroglucinol kezelés hatása a HUVEC sejtek által szintetizált kollagén IV keresztkötöttségének mértékére. A teljes sejtizátumból (TSL) készült Western blot alapján a peroxidázinhibitor phloroglucinol (PhG) 48 órán keresztül jelenléte nem befolyásolta a sejtekben kifejeződő PXDN mennyiségét (A). A fehérje enzimaktivitásának hiánya a kollagén IV NC1 domének keresztkötésének kieséséhez vezetett, amit a kollagenázzal emésztett sejtizátumokból (KEL) készült Western bloton az α - $\alpha 2$ kollagén IV ellenanyaggal kapott 55 kDa-os jel eltűnése támaszt alá (B).

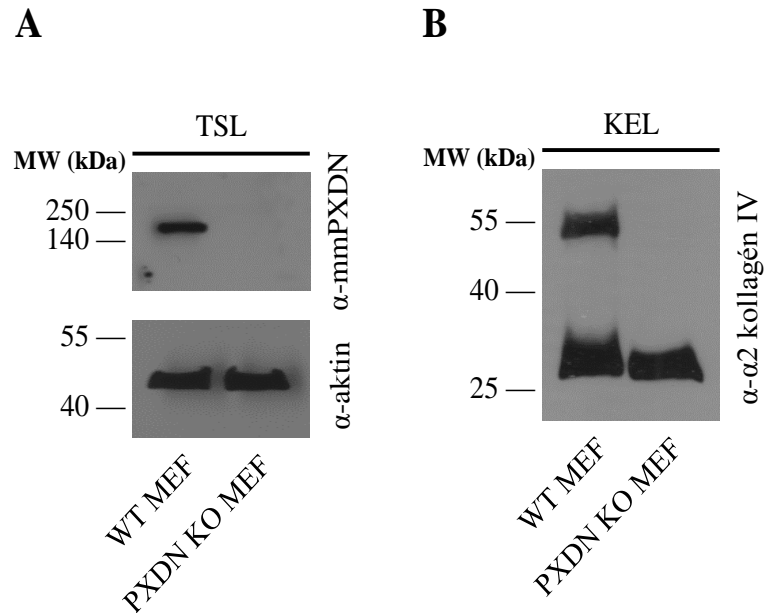
A PXDN enzimaktivitásának kollagén IV szintézisben játszott szerepét phloroglucinol (PhG) nevű általános peroxidázinhibitor alkalmazásával teszteltük. A teljes sejtlizátum Western blot vizsgálata során detektált jel alapján az endogén PXDN expressziója nem változott meg a gátlószer adását követő 48 órában (*19.A ábra*), a PhG jelenlétében tenyésztett sejtek kollagenázzal emésztett mintáiban azonban mindhárom kimutatott kollagén IV izoforma esetében drasztikusan lecsökkent a keresztkötött NC1 dimerek mennyisége. Az 5.6. fejezetben ismertetett technikai megfontolások miatt jelen fejezetben az $\alpha 2$ izoformát felismerő ellenanyaggal kapott eredmények bemutatására szorítkozom (*19.B ábra*).

6.1.2. Kollagén IV keresztkötés detektálása vad típusú és PXDN génhíányos MEF sejtekben

A humán sejtek vizsgálatával nyert eredményeket olyan rendszerből származó adatokkal is ki kívántuk egészíteni, amely kiküszöböli az enziminhibitorral történő kezelés nem teljes specificitásából vagy részleges hatékonyságából eredő bizonytalanságokat. Ehhez optimális eszköznek bizonyultak a laborunk részére cink-ujjas nukleáz technológia alkalmazásával előállított PXDN génhíányos, illetve vad típusú C57BL/6 tenyészet egerei. Heterozigóta állatok időzített pároztatásával létrejött terhességekből vad típusú (WT) és knockout (KO) testvérpár embriókat izoláltunk. Az állatok genotipizálásával párhuzamosan testfalukból embrionális fibroblasztokat (MEF) nyertünk ki, így a HUVEC sejtekhez hasonlóan megtartott osztódóképességű, primer sejtenyészethez jutottunk.

A sejtek redukált lizátumát vizsgáló Western blot kísérletekben laborunk saját készítésű, az egér PXDN C-terminális szakasza ellen nyúlban termeltetett, poliklonális ellenanyaga segítségével igazoltuk a vad típusú és PXDN-deficiens MEF sejtek fenotípusát (*20.A ábra*). A fibroblasztok kollagenázzal emésztett mintáiból készült Western blotban analizáltuk azok kollagén IV expressziós profilját, melynek során az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ láncokat felismerő ellenanyaggal kaptunk intenzív jeleket. Az eltérő genotípusú MEF sejtek értékelése során szembeötlő volt a keresztkötött NC1 domének teljes hiánya a knockout mintákban, szemben a vad típusban 55 kDa környékén megfigyelhető erős szignállal. A két kollagén IV izoforma vizsgálata során egybehangzó eredményt kaptunk,

az 5.6. fejezetben tárgyalt okoknál fogva azonban a dolgozatban csak az $\alpha 2$ -specifikus antitesttel előhívott Western blotot mutatom be (20.B ábra).



20. ábra: Vad típusú és PXDN-deficiens MEF sejtek kollagén IV keresztükötő képességének összehasonlítása. A sejtek lízisével nyert minták (TSL) Western blot vizsgálatával igazoltuk a vad típusú (WT) mintában detektálható PXDN jel hiányát a knockout (KO) állatokból származó fibroblasztokban (A). A vad típusú sejtek kollagenázzal emésztett lizátumát (KEL) vizsgáló Western blotban 55 és 25 kDa-nál megjelenő, kettős jellel szemben PXDN hiányában csak monomer NC1 doméneket tudtunk kimutatni az α - $\alpha 2$ kollagén IV ellenanyag segítségével (B).

Eredményeink alapján az endogén humán PXDN enzimaktivitásának farmakológiai gátlása a HUVEC sejtek kollagén IV keresztükötő képességének jelentős mértékű károsodását vonja maga után, a PXDN fehérje teljes hiányához vezető genomszintű módosítás pedig az NC1 dimerképzés megszűnését eredményezi az érintett egerekből izolált MEF sejtekben. Az élő szövetből származó primer sejtekkel végzett kísérleteink összefoglalásaként levonható a következtetés, hogy a megfelelő szerkezetű bazális membránok kialakulásának, azon belül is a kollagén IV hálózat kovalens keresztükötésének folyamatában az endogén emlős PXDN fiziológiás körülmények között is esszenciális résztvevő.

6.2. A PXDN negyedleges szerkezetének elemzése

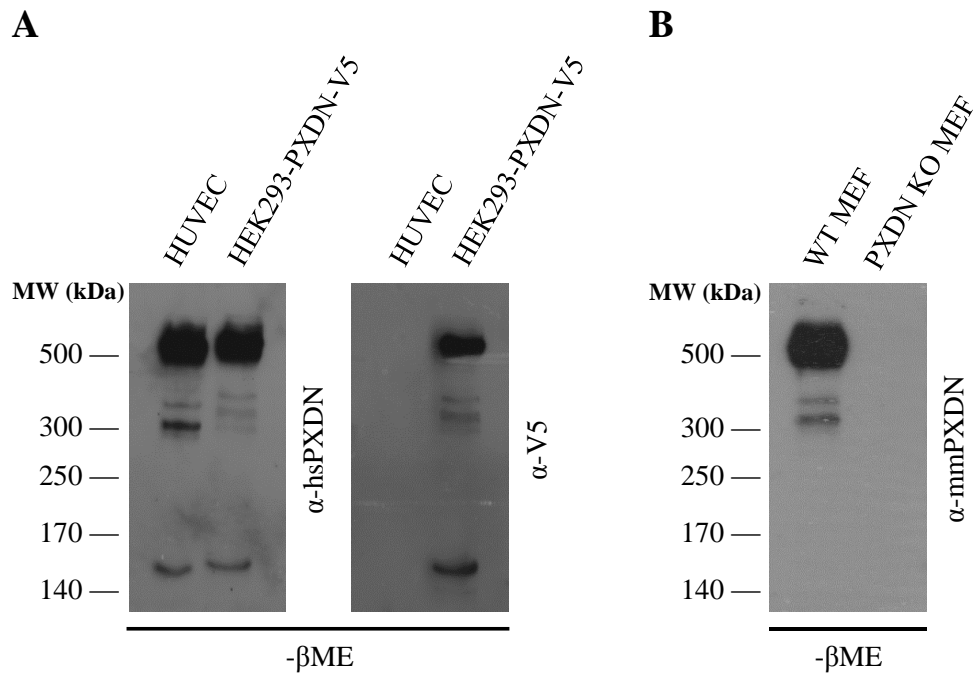
A PXDN komplex doménstruktúrájú fehérje, amelyben egy katalitikusan aktív peroxidáz domén kombinálódik az ECM komponenseire jellemző szerkezeti elemekkel. Számos, enzimaktivitással nem rendelkező mátrixfehérjéről, köztük a lamininról és magáról a kollagén IV-ről is ismert, hogy oligomerizációt követően rendeződnek összetettebb szupramolekuláris struktúrákba.¹¹² Emellett a hem-peroxidáz család több tagjáról is bebizonyosodott, hogy homodimer szerkezetet képez, az alegységek között kialakuló kötés kémiai jellege azonban eltérő az egyes fehérjék esetében. Amíg az MPO intermolekuláris diszulfidhíd létesítésével rendeződik dimer formába,^{38,51} az LPO esetében az endogén enzimaktivitás segítségével képzett ditirozinkötés tartja össze a két alegységből álló komplexet.⁶⁴

A PXDN első részletes leírását tartalmazó közleményben a szerzők a *Drosophila* fehérje kapcsán igazolták, hogy az homotrimer formában szekretálódik az extracelluláris térbe, azonban sem a trimerizáció mechanizmusát, sem annak esetleges funkcionális következményeit nem elemezték a továbbiakban.⁷⁶ Ezeket a hiányosságokat munkacsoportunk az emlős PXDN szupramolekuláris szerkezetének részletes elemzésével kívánta betölteni, és az esetleges oligomerképzési folyamatért felelős molekuláris részletek pontos azonosítását is célul tűztük ki.

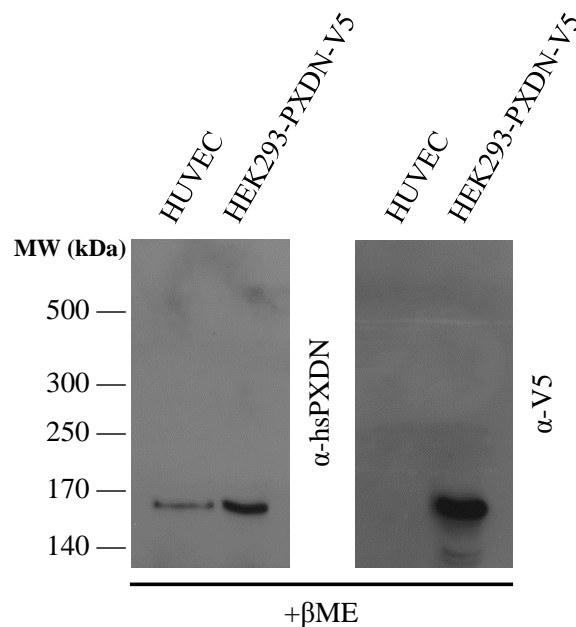
6.2.1. Az emlős PXDN redukcióra érzékeny homotrimert formál

Az endogén emlős PXDN részvételével kialakuló fehérjekomplexeket első megközelítésben HUVEC sejtekből készült lizátumokban vizsgáltuk. A β -merkaptotanol (β ME) hozzáadása nélkül készült minták nagy molekulatömegű fehérjealkotóit 4%-os SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét, majd blotolást követően a fehérje C-terminálisát felismerő antitestet alkalmazva mutattuk ki a denaturáló, de nem redukáló közegben megőrzött PXDN-t tartalmazó fehérjekomplexeket. A Western blotban három domináns csík jelent meg 160, 300 és 500 kDa-os molekulatömeg könyékén, amelyek közül a legmagasabbnál tapasztaltuk a legintenzívebb jelet (*21.A ábra*). A V5-tag-gel ellátott, rekombináns humán PXDN-t nagy mennyiségben kifejező stabil HEK293FS sejtvonal nem redukált lizátumát analizálva a

PXDN-pozitív csíkoknak a HUVEC mintában tapasztaltnal azonos elrendeződését figyeltük meg (21.A ábra). Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy mind az endogén, mind a rekombináns humán PXDN magas molekulatömegű oligomert formál, vagy ismeretlen fehérjepartnerrel alkot heterokomplexet. Annak tisztázására, hogy vajon fajspecifikus jelenségről van-e szó, MEF sejtek hasonlóan kezelt mintáival is elvégeztük a kísérletet, amelyben az egér szekvencia C-terminálisát felismerő antitestet alkalmazva a humán sejteknél látottak megfelelő magasságokban detektáltunk PXDN-t tartalmazó komplexeket (21.B ábra). A vizsgált lizátumok β -merkaptóetanollal történő kezelése következtében a magas molekulatömegű komplexek szétestek és csak a monomer PXDN lánc számított molekulatömegének megfelelő 165 kDa-os magasságban észleltünk PXDN-specifikus jelet a Western blotban (22. ábra).

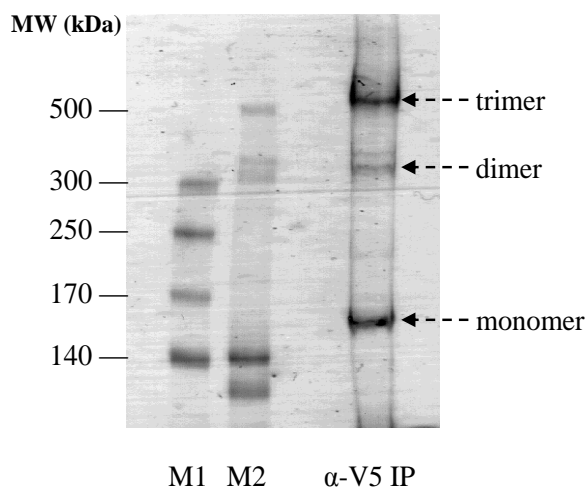


21. ábra: PXDN-tartalmú fehérjekomplexek Western blot analízise. A HUVEC és a PXDN-V5-öt stabilan expresszáló HEK293 sejtek β -merkaptóetanol (β ME) hozzáadása nélkül készült lizátumainak vizsgálata során 500, 300 és 160 kDa-nál detektáltunk PXDN-specifikus jeleket (A). A vad típusú (WT) MEF sejtek nem redukált mintáiban az egér PXDN-t tartalmazó komplexeket a humán fehérje esetében megfigyelt jelek magasságában, a knockout (KO) mintával szemben specifikusnak bizonyuló szignál alapján mutattuk ki (B).



22. ábra: A PXDN-tartalmú fehérjekomplexek redukálószer-érzékenységének vizsgálata. A HUVEC és PXDN-V5-öt kifejező HEK293 sejtek lizátumából β -merkaptoetanol (β ME) hozzáadását és a minta forralását követően eltűntek a PXDN részvételével képzett magas molekulatömegű komplexek, és a Western blot analízis során csak 165 kDa-nál kaptunk az endogén vagy a rekombináns PXDN-hez köthető szignált.

Összetételük meghatározása céljából a stabil HEK sejtekben kialakuló, PXDN-t tartalmazó komplexeket a C-terminális V5-tag-et felismerő antitesthez konjugált gyönggyel izoláltuk a sejtek lizátumából. Az immunprecipitátum szétválasztásra használt fehérjegél Coomassie-festését követően a már említett három, 500, 300 és 160 kDa-os molekulatömegnél detektáltunk fehérjekomplexeket (23. ábra).



23. ábra: Immunaffinitás-kromatográfiával tisztított PXDN-V5-tartalmú fehérjekomplexek kimutatása. A rekombináns PXDN-t kifejező stabil HEK293 sejtekből a C-terminális V5 tag-et felismerő antitesttel precipitált (α -V5 IP) fehérjéket a szétválasztásukra használt poliakrilamid gél Coomassie festésével tettük láthatóvá. A fehérjesávok a lizátum Western blot vizsgálata során tapasztalt elrendezésben, a fehérjemarkerek (M1 és M2) alapján 500, 300 és 160 kDa-nak becsült magasságban jelentek meg. A géldarabokból izolált fehérjeminták proteomikai elemzése alapján valószínűsíthető, hogy azok a PXDN trimerizációs folyamatának kiindulási, köztes és végső állapotát jelenthetik.

A fehérjesávokat tartalmazó géldarabokat kimetszettük, majd az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Proteomikai Kutatócsoportjában dolgozó együttműködő partnereink segítségével tömegspektrometriai vizsgálatban határoztuk meg azok összetételét. A tripszinnel emésztett minták analízise során az 500 (24. ábra), 300 és 160 kDa-os minták esetében is csak a PXDN szekvenciájára illeszkedő peptidfragmentumokat azonosítottunk.

1. gi|109150416 Score: 1542

peroxidasin homolog precursor [Homo sapiens]

Found in search of D:\lcq_fleet\data\2012\12augusztus\GM\120801_08_GM1_500kDa.mgf

Nominal mass (Mr): 167793; Calculated pI value: 6.79

Sequence Coverage: 37%

| Start | End | Observed | Mr (expt) | Mr (calc) | Delta | Miss | Sequence |
|-------|--------|-----------|-----------|-----------|---------|------|--|
| 49 | - 70 | 821.6949 | 2462.0629 | 2462.3025 | -0.2396 | 0 | R. CMHLLLEAVPAVAPQTSILDLR. F Oxidation(M) (Ions score 108) |
| 87 | - 99 | 756.4180 | 1510.8215 | 1510.8467 | -0.0252 | 0 | R. NLNTLLNNQIK. R (Ions score 105) |
| 101 | - 113 | 716.8824 | 1431.7503 | 1431.7245 | 0.0258 | 0 | R. IPSGAFEDLENLKY. Y (Ions score 87) |
| 101 | - 127 | 808.6701 | 3230.6513 | 3230.6499 | 0.0014 | 2 | R. IPSGAFEDLENLKYLYKNEIQSIDR. Q (Ions score 64) |
| 187 | - 208 | 900.1682 | 2697.4828 | 2697.3618 | 0.1210 | 1 | R. LRSDNTLHCDCEILWLADLLK. T (Ions score 60) |
| 189 | - 208 | 810.3778 | 2428.1117 | 2428.1767 | -0.0650 | 0 | R. LDSNTLHCDCEILWLADLLK. T (Ions score 56) |
| 209 | - 226 | 986.4603 | 1970.9060 | 1970.8792 | 0.0268 | 0 | K. TYAESGNAQAAACEYPR. R (Ions score 89) |
| 248 | - 268 | 1181.0571 | 2360.0996 | 2360.0591 | 0.0406 | 0 | R. ITSEPDQADVTSGNTVYFTR. A (Ions score 131) |
| 294 | - 320 | 1043.9713 | 3128.8921 | 3128.4464 | 0.4456 | 0 | R. LNLDDGTLMIQNTQETDQGIYQCMK. N Oxidation(M) (Ions score 78) |
| 294 | - 320 | 1049.1142 | 3144.3208 | 3144.4413 | -0.1206 | 0 | R. LNLDDGTLMIQNTQETDQGIYQCMK. N 2 Oxidation(M) (Ions score 135) |
| 335 | - 372 | 1035.5244 | 4138.0685 | 4138.0582 | 0.0103 | 0 | R. YFGSPARPTFVIQPNTEVLVGSVTLCEATGHPHPP. I (Ions score 44) |
| 443 | - 457 | 861.9242 | 1721.8337 | 1721.8295 | 0.0043 | 0 | R. VVIEGQTVDFQCEAK. G (Ions score 110) |
| 458 | - 468 | 590.2765 | 1178.5384 | 1178.6448 | -0.1064 | 0 | K. GNPPFVIAWTK. G (Ions score 59) |
| 479 | - 488 | 541.8675 | 1081.7205 | 1081.6244 | 0.0961 | 0 | R. HLVLSSQTLR. I (Ions score 43) |
| 513 | - 522 | 560.3581 | 1118.7016 | 1118.6560 | 0.0456 | 0 | K. VVAHLTVQPR. V (Ions score 53) |
| 571 | - 597 | 748.6155 | 2990.4327 | 2990.4345 | -0.0018 | 1 | K. FHISPEGFLTINDVGFADAGRYECVAR. N (Ions score 69) |
| 619 | - 637 | 988.1190 | 1974.2234 | 1974.0058 | 0.2176 | 0 | R. NGDPFFVATSIIVEAIATVDR. A (Ions score 121) |
| 653 | - 662 | 573.3472 | 1144.6798 | 1144.6240 | 0.0557 | 0 | R. SPNDLLALFR. Y (Ions score 77) |
| 666 | - 674 | 539.7693 | 1077.5241 | 1077.5091 | 0.0150 | 0 | R. DPYTVQAR. A (Ions score 53) |
| 743 | - 765 | 665.5702 | 2658.2518 | 2658.1704 | 0.0814 | 0 | R. THDGTGNLQHPMVGASLTAFAER. L Oxidation(M) (Ions score 40) |
| 769 | - 779 | 642.3229 | 1282.6312 | 1282.5942 | 0.0370 | 0 | K. SVYENGFTNPR. G (Ions score 56) |
| 786 | - 796 | 642.8740 | 1283.7335 | 1283.6445 | 0.0890 | 0 | R. LYNHALMPER. L Oxidation(M) (Ions score 42) |
| 881 | - 900 | 1088.0364 | 2174.0582 | 2173.9806 | 0.0776 | 0 | R. SSPVCGSGMTSLMNSVYPR. E 2 Oxidation(M) (Ions score 156) |
| 901 | - 924 | 909.0691 | 2724.1854 | 2724.2627 | -0.0772 | 0 | R. EQINQLTSYIDASNVSSTEAR. S (Ions score 77) |
| 944 | - 977 | 953.9995 | 3811.9691 | 3811.7757 | 0.1934 | 1 | R. SGKPLFPFATGPPTECMRDNESPIPCFLAGDHR. A Oxidation(M) (Ions score 45) |
| 1021 | - 1037 | 678.4703 | 2032.3890 | 2032.0894 | 0.2995 | 0 | K. IVGAELIQHITQHWLEK. I (Ions score 47) |
| 1108 | - 1119 | 648.3667 | 1294.7188 | 1294.7245 | -0.0057 | 0 | R. IVNEGIDPLLR. G (Ions score 63) |
| 1130 | - 1142 | 750.4510 | 1498.8874 | 1498.7991 | 0.0883 | 0 | R. VPSQLLNTLTERLFSMAHTVALDLAAINIQR. G Oxidation(M) (Ions score 50) |
| 1130 | - 1161 | 896.0288 | 3580.0862 | 3579.9083 | 0.1779 | 1 | R. VPSQLLNTLTERLFSMAHTVALDLAAINIQR. G Oxidation(M) (Ions score 50) |
| 1228 | - 1241 | 812.9553 | 1623.8960 | 1623.8364 | 0.0596 | 0 | R. LGPFLMCLLSTQFK. R Oxidation(M) (Ions score 84) |
| 1245 | - 1266 | 845.3812 | 2533.1218 | 2533.2601 | -0.1383 | 1 | R. DGDRLWYENGVFSPAQLTQIK. Q (Ions score 109) |
| 1249 | - 1266 | 1046.0689 | 2090.1232 | 2090.0837 | 0.0396 | 0 | R. LWYENGVFSPAQLTQIK. Q (Ions score 59) |
| 1311 | - 1320 | 714.2849 | 1426.5552 | 1426.5064 | 0.0488 | 0 | R. VNQCCEDCR. T (Ions score 58) |
| 1336 | - 1349 | 576.6564 | 1726.9474 | 1726.8526 | 0.0948 | 1 | R. RSLEFSYQEDKPTK. K (Ions score 55) |
| 1410 | - 1428 | 664.3114 | 1989.9124 | 1989.8698 | 0.0426 | 0 | R. LSTTECVDAGGESHANNTK. W (Ions score 81) |

24. ábra: A HEK293-PXDN-V5 sejtekből izolált 500 kDa-os fehérjekomplex alkotóinak vizsgálata. Az α -V5 ellenanyaggal precipitált, magas molekulatömegű komplex összetételét együttműködő partnereink tömegspektrometriai analízissel határozták meg. A komplexből származó triptikus peptid LC-MS/MS vizsgálattal felvett spektrumai alapján a Mascot szerverrel végzett adatbázis-keresés a PXDN-t a minta egyedüli összetevőjeként azonosította. A 300 és 160 kDa-os minták ugyanezen protokollal végzett elemzése is azonos eredményre vezetett.

A HUVEC sejtek nem redukált lizátumában detektált magas molekulatömegű, PXDN-tartalmú csík összetételének meghatározásához PXDN-specifikus antitesttel végeztünk immunprecipitációt a sejt-lizátumból. Az izolált fehérjék gélelektroforézisét követően a domináns csíkot tartalmazó géldarabot kivágtuk és proteomikai analízisre küldtük ki, ami ennek a mintának is egyedüli összetevőjeként azonosította a PXDN-t (25. ábra).

1. gi|109150416 Score: 1125

peroxidasin homolog precursor [Homo sapiens]

Found in search of D:\OT_elite\2013\13aprilis\gm\130410_04_500kDa_ITMSms2cid.txt

Nominal mass (M_r): 167793; Calculated pI value: 6.79

Sequence Coverage: 27%

```

1 MAKRSRGPGR RCLLALVLFCAWGTFLAVVAQ KPGAGCPSRC LCFRTTVRCM HLLLEAVPAV APQTSILDLR FNRIREIQPG AFRRLRNLNT LLLNNNQIKR
101 IPSGAFEDLE NLKYLKLYKN EIQSIDRQAF KGLASLEQLY LHFNQIETLD PDSFQHLPKL ERLFLHNNRI THLVPGTFNH LESMKRLRLD SNTLHDCDEI
201 LWLADLLKTY AESGNAQAAA ICEYPRRIQG RSVATITPEE LNCERPRITS EPQDADVTSG NTVYFTCRAE GNPKEIINL RNNNELSMKT DSRNLNLLDDG
301 TLMIGNTQET DQGIYQCMAK NVAGEVKTQE VTLRYFGSPA RPTFVIQPN TEVLVGSVLT LECSATGHPP PRISWTRGDR TPLPVDPRVN ITPSGGLYIQ
401 NVVQDGSSEY ACSATNNIDS VHATAFIIVQ ALPQFTVTPQ DRVVIEQTV DFQCEAKGNP PPIVIAWTKGG SQLSVDRRHL VLSGGTLRIS GVALHDQQQY
501 EQQAVNIIGS QKVVHLTVQ PRVTPVFASI PSDTTVEVGA NVQLPCSSQC EPEPAITWNK DGVQVTESGK FHISPEGFLT INDVGPADAG RYECVARNTI
601 GSASVSMVLS VNVVDVSRNG DPFVARSIVE AIATVDRAIN STRTHLFDNR PRSPNDLLAL FRYPRDPYTV EQARAGEIFE RTLQLIQEHV QHGLMVDLNG
701 TSYHYNDLVS FQYLNLIANL SGCTAHRRVN NCSDMCFHQK YRTHDGTENN LQHPMWSASL TAFFERLLKSV YENGFNTFRG INPHRLYNGH ALPMFRLVST
801 TLLIGTEVTF DEQFTHMLMQ WQFLDHDLD STVVALSQAR FSDGQHCNSV CSNDPPCFSV MIPFNDSRAR SGARCMFFVR SSVVCGSGMT SLLMNSVYPR
901 EQINQLTSYI DASNVYGSTE HEARSIRDLA SHRGLLRQGI VQRSGKPLLP FATGPPTECM RDNESPIPC FLAGDHRANE QLGLTSMHTL WFEHNRRIAT
1001 ELLKLNPHWD GDTIYYETRK IVGAEIQHIT YQHHLPKILG EVGMRTLGEY HGYPGGINAG IFNAFATAAF RFGHTLVNPL LYRLDENFQP IAQDHLPLHK
1101 AFFSPFRIVN EGGIDPLLRG LFGVAGKMRV PSQLLNTLTL ERLFSMAHTV ALDLAAINIQ RGRDHGIPPY HDYRVYCNLS AAHTFEDLKN EIKNPEIREK
1201 LKRLYGSVTLN IDLFPALVLE DLVPGSRLGP TMLCLLSTQF KRLRDGDRWL YENPGVFSQA QLTQIKQTSL ARILCDNADN ITRVQSDVFR VAEFPHGYS
1301 CDEIPRVDLR VMQCCEDCR TRGQFNAFSY HFRGRSLEF SYQEDKPTK TRPRKIPSVG RQGEHLSNST SAFSTRSDAS GTNDFREFVL EMQKTTITDLR
1401 TQCKLESRL ESTEVCVAGG ESHANNTKWK KDACTICECK DGVQTCFVEA CPPATCAVPV NIPGACPCV LQKRAEKP

```

| Start | End | Observed | Mr (expt) | Mr (calc) | ppm | Miss | Sequence |
|-------|--------|-----------|-----------|-----------|-----|------|--|
| 85 | - 100 | 646.3845 | 1936.1317 | 1936.1330 | -1 | 2 | R.LRNLNTLLNNNQIKR.I (Ions score 44) |
| 87 | - 99 | 756.4309 | 1510.8472 | 1510.8467 | 0 | 0 | R.NLNTLLNNNQIKR.R (Ions score 75) |
| 114 | - 127 | 909.4761 | 1816.9376 | 1816.9359 | 1 | 1 | K.YLYLYKNEIQSIDR.Q (Ions score 44) |
| 248 | - 268 | 1181.0350 | 2360.0554 | 2360.0591 | -2 | 0 | R.ITSEFQDADVTSGNTVYFTCR.A (Ions score 52) |
| 269 | - 281 | 761.9221 | 1521.8296 | 1521.8303 | -0 | 0 | R.AEENKPEIINLR.N (Ions score 52) |
| 321 | - 334 | 772.4261 | 1542.8376 | 1542.8366 | 1 | 1 | K.NVAGEVKTQEVTLR.Y (Ions score 67) |
| 443 | - 457 | 861.9221 | 1721.8296 | 1721.8295 | 0 | 0 | R.VVIEGQTVDFQCEAK.G (Ions score 63) |
| 458 | - 468 | 590.3293 | 1178.6440 | 1178.6448 | -1 | 0 | K.GNPPPIVIAWTK.G (Ions score 39) |
| 479 | - 488 | 541.8194 | 1081.6242 | 1081.6244 | -0 | 0 | R.HVLLSSGTLR.I (Ions score 28) |
| 513 | - 522 | 560.3352 | 1118.6558 | 1118.6560 | -0 | 0 | K.VVHLTVQPR.V (Ions score 43) |
| 598 | - 618 | 1074.5510 | 2147.0874 | 2147.0892 | -1 | 0 | R.NTIGSASVSMVLSNVVDVSR.N Oxidation (M) (Ions score 96) |
| 619 | - 637 | 988.0109 | 1974.0072 | 1974.0058 | 1 | 0 | R.NGDPFVARSIVEAIATVDRA.A (Ions score 108) |
| 653 | - 662 | 573.3190 | 1144.6234 | 1144.6240 | -1 | 0 | R.SPNDLLALFR.Y (Ions score 73) |
| 663 | - 674 | 498.9161 | 1493.7265 | 1493.7263 | 0 | 1 | R.YPRDPYTVQAR.A (Ions score 42) |
| 666 | - 674 | 539.7613 | 1077.5080 | 1077.5091 | -1 | 0 | R.DPYTVQAR.A (Ions score 32) |
| 675 | - 681 | 411.2110 | 820.4074 | 820.4079 | -1 | 0 | R.AGEIFER.T (Ions score 60) |
| 769 | - 779 | 642.3062 | 1282.5978 | 1282.5942 | 3 | 0 | K.SVYENGENTPR.G (Ions score 50) |
| 786 | - 796 | 642.8298 | 1283.6450 | 1283.6445 | 0 | 0 | R.LYNGHALMPRL Oxidation (M) (Ions score 41) |
| 881 | - 900 | 1088.0007 | 2173.9868 | 2173.9806 | 3 | 0 | R.SSPVCGSGMTSLLMNSVYPR.E 2 Oxidation (M) (Ions score 50) |
| 901 | - 924 | 909.0956 | 2724.2650 | 2724.2627 | 1 | 0 | R.EQINQLTSYIDASNVYGSTHEAR.S (Ions score 51) |
| 925 | - 933 | 527.7911 | 1053.5676 | 1053.5679 | -0 | 1 | R.SIRDLASHR.G (Ions score 28) |
| 1046 | - 1071 | 925.1174 | 2772.3304 | 2772.3296 | 0 | 0 | R.TLGEYHGYPGGINAGIFNAFATAFR.F (Ions score 31) |
| 1108 | - 1119 | 648.3696 | 1294.7246 | 1294.7245 | 0 | 0 | R.IVNEGGIDPLLR.G (Ions score 67) |
| 1143 | - 1161 | 1050.5680 | 2099.1214 | 2099.1197 | 1 | 0 | R.LFSMAHTVALDLAAINIQR.G Oxidation (M) (Ions score 77) |
| 1204 | - 1227 | 1294.7045 | 2587.3944 | 2587.3898 | 2 | 0 | R.LYDGLTINIDLFPALVVDLVPGRS.L (Ions score 37) |
| 1245 | - 1266 | 845.4254 | 2533.2544 | 2533.2601 | -2 | 1 | R.DGDRLWYENPGVFSQAQLTQIK.Q (Ions score 40) |
| 1336 | - 1349 | 576.6249 | 1726.8529 | 1726.8526 | 0 | 1 | R.RSLEFSYQEDKPTK.K (Ions score 38) |
| 1337 | - 1349 | 786.3818 | 1570.7490 | 1570.7515 | -2 | 0 | R.SLEFSYQEDKPTK.K (Ions score 36) |
| 1377 | - 1394 | 697.3217 | 2088.9433 | 2088.9422 | 0 | 1 | R.SDASGNTDFREFVLEMOK.T Oxidation (M) (Ions score 46) |
| 1395 | - 1404 | 594.8508 | 1187.6870 | 1187.6874 | -0 | 1 | K.TITDLRTQIK.K (Ions score 42) |

25. ábra: A HUVEC sejtekből tisztított 500 kDa-os fehérjekomplex proteomikai elemzése. A PXDN-specifikus immunprecipitációval izolált domináns fehérjekomplex tripszin emésztésével nyert proteinfragmentumokból együttműködő partnereink LC-MS/MS vizsgálatot végeztek, majd a kapott adatokat Mascot szerver segítségével vetették össze az NCBI legfrissebben elérhető nem redundáns protein adatbázisával. Az analízis ebben az esetben is csak a PXDN-nek megfelelő peptidszekvenciák jelenlétét igazolta a vizsgált mintában.

A tömegspektrometriai analízis eredményei, illetve a PXDN-pozitív fehérjesávok látszólagos molekulatömege alapján valószínűsíthető, hogy az emlős PXDN szintézise során a *Drosophila* fehérjéhez hasonlóan redukcióra érzékeny homotrimer negyedleges szerkezetet képez, ami mind az endogén, mind a rekombináns fehérje domináns megjelenési formáját jelenti. Az 500 kDa körüli trimer mellett a 300 kDa-os komplex valószínűleg a dimer köztiterméket, a 160 kDa-os jel pedig monomer kiindulási formát jelentheti az oligomerizációs folyamatban.

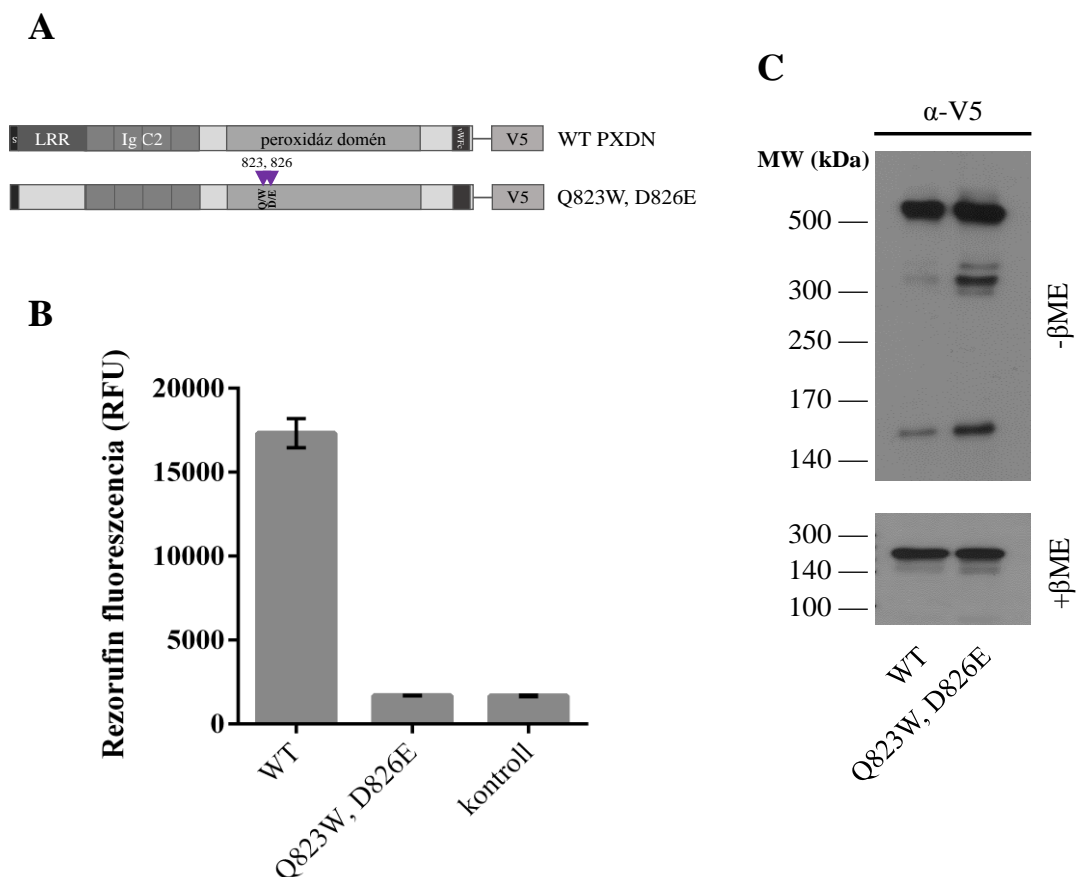
A homotrimer asszociációjának mechanizmusát vizsgáló további kísérleteinkhez szükséges konstruktokat minden esetben a humán PXDN-t kódoló, C-terminális V5 taggel ellátott rekombináns plazmid módosításával hoztuk létre, oligomerizációs készségüket pedig tranziensen transzfektált HEK293FS sejtek nem redukált lizátumából készült Western blotokon, a V5-tag-et felismerő antitest felhasználásával elemeztük. A transzfekciós hatékonyságot minden esetben a redukált mintákban kapott V5-specifikus jel segítségével ellenőriztük.

6.2.2. A PXDN enzimaktivitása és trimerizációja közötti kapcsolat vizsgálata

Mivel ismert, hogy az LPO saját katalitikus aktivitásától függő módon képez homodimert,⁶⁴ a PXDN esetében is kíváncsiak voltunk arra, hogy a fehérje endogén peroxidázaktivitása esszenciális-e a trimer forma kialakításához. Ehhez egy olyan enzimaktivitás-hiányos mutáns konstruktot terveztünk, amelynek alapját a PXDN természetes funkcióvesztéses mutánsa, a PXDNL aminosavsorrendjének jellegzetességei adták. A hem-peroxidázok katalitikus doménjének szekvenciái homológok egymással, a PXDNL azonban két olyan eltérést is tartalmaz a család többi tagjához képest, amely a hem kötésében alapvető jelentőségű aminosavakat érint, és így meggátolja a peroxidázaktivitás szempontjából elengedhetetlen prosztetikus csoport kötését. A vad típusú humán PXDN-t kódoló rekombináns konstrukt irányított mutagenézisével a szóban forgó 823. pozíciójú glutamin és 826. helyen található aszpartát aminosavakat a PXDNL szekvencia megfelelő pozíciójában elhelyezkedő triptofánra és glutamatra cseréltük, így létrehozva a Q823W, D826E konstruktot (26.A ábra). A funkcióvesztéses mutáns fehérje *in vitro* enzimaktivitását tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumának Amplex Red peroxidáz assay-ben történő mérésével hasonlítottuk a vad típusú PXDN-t

kódoló (WT), illetve üres konstrukttal transzfektált kontroll sejtek értékeihez. A bevitt mutációk várakozásainknak megfelelően valóban megszüntették a Q823W, D826E konstrukttal peroxidázaktivitását (26.B ábra), azonban nem befolyásolták a rekombináns fehérje trimerképzését tranziensen transzfektált HEK293FS sejtekben (26.C ábra).

Kísérleteinkből levonható a következtetés, hogy az endogén peroxidázaktivitás nem szükséges feltétele a PXDN oligomerizációjának, és a domináns trimer formát összetartó molekuláris interakciók a fehérje enzimaktivitásától független módon alakulnak ki.

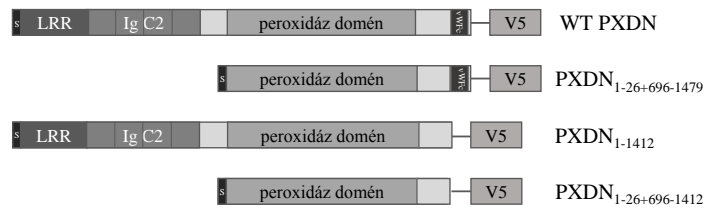
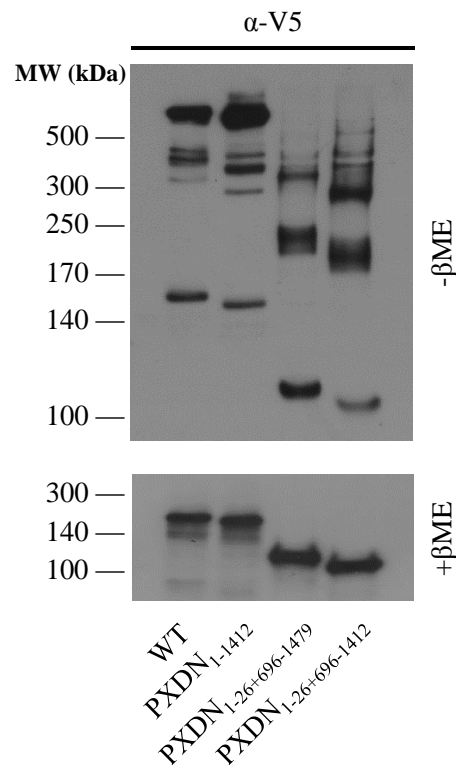


26. ábra: A PXDN oligomerformálása és endogén peroxidázaktivitása közötti összefüggés vizsgálata. A vad típusú PXDN konstruktból (WT) kiindulva két, a hem kötéséhez esszenciális aminosavat érintő cserével hoztuk létre a Q823W, D826E konstruktot (A). Tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumának Amplex Red peroxidáz assay-ben történő mérése során a mutáns konstrukttal tartalmazó minta a negatív kontrollként használt üres plazmida transzfektált sejt-lizátummal azonos peroxidázaktivitást mutatott (B, reprezentatív mérés; az ábrán három technikai párhuzamos szórása van feltüntetve). A konstrukttal kifejező HEK293 sejtek β -merkaptóetanol (β ME) hozzáadása nélkül készült lizátumainak Western blot vizsgálata során a V5-specifikus jelek azonos elrendeződését tapasztaltuk, aminek alapján peroxidázaktivitás elvesztésével járó mutációk nem befolyásolták a rekombináns konstrukttal trimerizációs képességét (C).

6.2.3. A PXDN trimerformálásában szerepet játszó molekulaszakaszok azonosítása

A peroxidáz doménon túl a PXDN-t alkotó többi jellegzetes harmadlagos szerkezetet kialakító molekulaszakasz, így a leucin-gazdag ismétlődések (LRR), az immunglobulin C2-szerű domének (Ig C2), az α -helikális régió és a von Willebrand faktor C-típusú domén (vWF C) megfelelőit is leírták már egyéb fehérjék oligomerizációjának kulcsrégiójaként. A PXDN esetében is célunk volt azonosítani a fehérje azon részeit, amelyeken keresztül a homotrimer összeállásához és stabilizálásához szükséges intermolekuláris kölcsönhatások létrejöhetnek. Első megközelítésben doménhiányos PXDN konstrukt könyvtárat klónoztunk (27.A ábra), hogy azonosítani tudjuk azt a legrövidebb, intakt doménekből felépülő PXDN szegmenst, amelyik megtartott trimerizációs képességgel rendelkezik. A szekrécióna kerülő fehérjék többségének szabályos foldingja és az általuk formált intra- és esetleges intermolekuláris diszulfidhidak megfelelő pozícionálása az endoplazmás retikulum oxidatív közegében, a lumenben elhelyezkedő chaperon fehérjék közreműködésével megy végbe. Hogy ezt lehetővé tegyük a rekombináns fehérjeláncok esetében is, a doméndeléciós PXDN konstruktokba minden esetben beillesztettük a humán PXDN N-terminális 26 aminosavából álló szekrécióna szignál szekvenciáját (S) is, amely a polipeptidlánc szintézisét követően azt közvetlenül az endoplazmás retikulumba irányítja. Tranziensen transzfektált HEK293FS sejtek lizátumának Western blot analízise alapján a vWF C domén nélküli PXDN₁₋₁₄₁₂, az LRR és Ig C2 doméneket nem tartalmazó PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₇₉ és az előbbieket kombinációjával létrehozott PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₁₂ konstruktok mindegyike megtartotta trimerformálási képességét (27.B ábra).

A vizsgált legkisebb, oligomerizációt mutató konstrukt szerkezete alapján a homotrimer kialakításáért felelős molekularészletek a humán PXDN 696. és 1412. aminosava közé eső, a peroxidáz domén kezdetétől az α -helikális régió végéig húzódó szakaszon helyezkednek el.

A**B**

27. ábra: A PXDN trimerizációjában résztvevő aminosavrégiók azonosítása. Az egyes domének jelentőségét a PXDN oligomerizációjának folyamatában N- és C-terminálisan trunkált rekombináns PXDN konstruktok Western blot analízisével vizsgáltuk (A). A tranziensen transzfektált HEK293 sejtek β-merkaptóetanollal (βME) nem redukált lizátumában a magas molekulatömegeknél megjelenő V5 jelek arra utalnak, hogy az N-terminális szekréciós szignál szekvencia megtartottsága esetén sem a vWF C domén, sem a LRR és Ig C2 régiók hiánya nem akadályozta meg az oligomerek kialakulását (B).

6.2.4. A PXDN homotrimeret stabilizáló diszulfidhidak pozíciójának vizsgálata

Megfigyelésünk, mely szerint az emlős PXDN által formált homotrimer β-merkaptóetanol jelenlétében monomerekre esik szét, azt sugallta, hogy a fehérjekomplex stabilitásáért felelős kötések legvalószínűbben diszulfidhidak lehetnek. Ezt a feltételezést támogatják a *Drosophila* PXDN által alkotott trimer redukálószer-érzékenységét⁷⁶ és az

MPO diszulfidhidképzésen keresztüli dimerizációs mechanizmusát tárgyaló irodalmi források is.^{38,51} A trunkált PXDN konstrukciókkal nyert eredményeink segítettek leszűkíteni azt a szekvenciaszakaszt, melyben a humán PXDN komplexképzéséért felelős aminosavak találhatóak, további kísérleteinkben pedig ezek pontos pozíciójának azonosítására törekedtünk.

6.2.4.1. A PXDN fehérjeláncon belül diszulfidhidat nem képző ciszteinek azonosítása többszörös szekvenciaillesztéssel

Ismert, hogy az állati hem-peroxidázok aminosavsorrendje homológiát mutat a PXDN katalitikus doménjének szekvenciájával. Emellett az MPO és LPO esetében a fehérjék részletesen tanulmányozott kristályszerkezete alapján ismertek azok a ciszteinek, amelyek intramolekuláris diszulfidhidak képzésével vesznek részt a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában.^{38,40,48,62,63} A humán PXDN és a többi hem-peroxidáz többszörös szekvenciaillesztéssel történő összehasonlítása lehetőséget nyújtott arra, hogy azonosítsunk olyan, identikus pozíciókban található ciszteineket, melyek feltételezhetően a PXDN-ben is a katalitikus domén szerkezetének stabilizálásában vesznek részt a monomeren belül (3. táblázat). A humán PXDN elemzett szakaszán 14 olyan cisztein található, amely megfeleltethető a másik négy hem-peroxidáz homológ pozícióiban szereplő aminosavaknak (28. ábra).

| Mieloperoxidáz | Peroxidazin |
|------------------|-----------------|
| Cys158*↔Cys319** | Cys723↔Cys885 |
| Cys167↔Cys180 | Cys732↔Cys748 |
| Cys281↔Cys291 | Cys847↔Cys857 |
| Cys285↔Cys309 | Cys851↔Cys875 |
| Cys387↔Cys398 | Cys959↔Cys970 |
| Cys606↔Cys663 | Cys1177↔Cys1234 |
| Cys704↔Cys730 | Cys1275↔Cys1301 |

3. táblázat: Intradomén diszulfidhidak predikciója az MPO és PXDN peroxidáz doménje közötti homológia alapján. A két szekvenciában identikus pozíciót elfoglaló ciszteinek részvételével képzett diszulfidkötések a MPO esetében igazoltan a katalitikus domén harmadlagos szerkezetét stabilizálják, melyek megfelelői vélhetően a PXDN szekvenciában is hasonló szereppel bírnak. A 158. cisztein a proMPO proteolízise során kivágódó régióban található (*), melynek feltételezett partnere, a 319. pozíciójú cisztein ezt követően az MPO dimer alegységeit összekötő diszulfidhidat alakítja ki. A PXDN-ben a két említett cisztein megfelelőit érintő, hasonló fehérjeérési lépés ezidáig nem ismert.

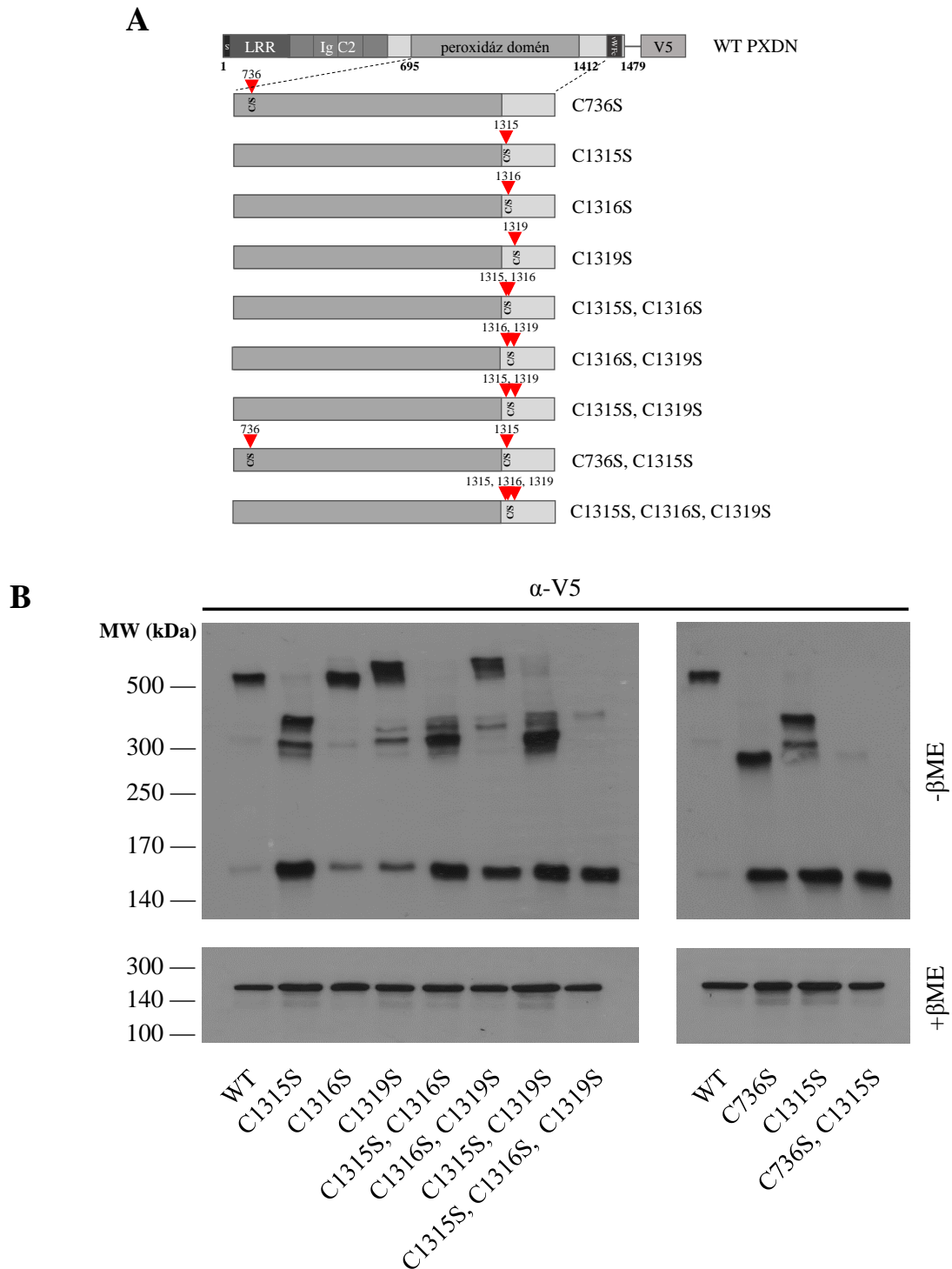
| | | |
|------|--|------|
| PXDN | MVLDNGTSYHYNDLVSPQYINLIANTISGCHFAHRRVNNCSDMCFHQKYRTHDGCNNLQHPMWSALTAFERLLKSVYVNGFNTPRGINPHRLXNGHALMPRLVSTLIG--TETVTPDEQFTHM | 817 |
| TPO | ---TQOSQHPDALSEDLISIIANMGGCLPYMLPCKPNTCLANKYRPTITGANNRDRPWGASNTALARWLPVYEDGFSOPRGWNPGLYNGFPLPVREVTRHVIQVSNVVTDDDRYSDL | 229 |
| LPO | ---LTVTD--FSLDLTSLSEVGCAPAPVYRCDP---CSPYRTITGQNNRRKALGAANRALARWLPAPAEYEDGLSDFWGTQKTRNGFPLPAREVSNKIVYLNEEGVLDQNRSL | 216 |
| EPX | ---RSGFFNVTDLTEPOLRLLSQASGALRQDAERFCS---DKYRTITGQNNRRKRLGASNAQALARWLPAPAEYEDGLSDFWGTQKTRNGFPLPAREVSNKIVYLNEEGVLDQNRSL | 223 |
| MPO | ---WRRPFNVTDLVITPAQNLVLSKSSGCAAYQDVGVYQPE---QDKYRTITGQNNRRKRLGASNAQALARWLPAPAEYEDGLSDFWGTQKTRNGFPLPAREVSNKIVYLNEEGVLDQNRSL | 251 |
| PXDN | LMQWQFLDHDLDSTVALSQAARFSDGQHCNSVCSNDPFFSWIIPNDSRARSARCFMFFVRSVPVGGSGMSTLMLN---SVYPREQINQLTYSIDASNVSSTHEHARSIRDLASHRGLLRQ- | 938 |
| TPO | LMWAGQVIDHDIATFQSTSKAAFGGGSQMTCEMNHCFPIQLPEE-ARPAAGTACLPFYRSAACTGTGDCALFNLSTANPQMMGLTFSLDASTVYSSPALERQLRNWTSAEGLLRVH | 353 |
| LPO | FMQWQIVDHDLDFAFDTELGSSSEYSKAQQDEYICIGDNCFPIFMFPNDPKATGQTKMCFRAGFVCPYPPY-----KSLAREQINALISFLDASFVYSEPSLASRLNLSPIGLMAMN | 333 |
| EPX | FMQWQIVDHDLDLDFEPESEARVAFTAGVDCERTCAQIPQFFIKIPNDPRIKNQRHCPFFRFAISFCQPN-----KNRVRNQINALISFVDASVMYSEVLSLRLNRNTNYLGLLAIN | 338 |
| MPO | FMQWQIVDHDLDLDFEPESEARVAFTAGVDCERTCAQIPQFFIKIPNDPRIKNQRHCPFFRFAISFCQPN-----NITIRNOINALISFVDASVMYSEVLSLRLNRNMSQJGLLAVN | 366 |
| PXDN | GIVORSKGPLLPEATGPT--EOM---RDENESPIPELAGDRANBQJLTSMHTLWFRHNRIATELLKLNPHWDGDTIYETRKLIVGAEIQIHTYQHWWPKLGEVGM-RILGEYHYDYPGIN | 1058 |
| TPO | GRLRDSGRAYLPPPPRFAAACAPEFCNPGETRGPCFLAGDGRASEVP SLTALHTLWLRHNRLAALKALNARHWSADAVYQEARVVYGAHQIITLRDYIPRI LGPEAFQYVGYEGYDSTAN | 478 |
| LPO | QEVSDHGLPLVYDYSKPS--HCE--FINNTARVPCFLAGDSRASBHI LLATSHITFLRHNRLARELKRNLNPOWDEKLYQEARKITLGAFVQIITPRDYLPILIGD-HMQKWIPPYQYSEYD | 453 |
| EPX | QRQDNGRALLPFDNLHDD--FCL---LTNRSARIPELAGDTRS TETPKLAAWHITLFRHNRLATELKRNLNPRWNGKLYNEARKIMGAMVQIITYRDFLPLVLGKARARITLGHYRGYCSNVD | 459 |
| MPO | QRQDNGRALLPFDNLHDD--FCL---LTNRSARIPELAGDTRS SEMPELTSMHTLRLRHNRLATELKRNLNPRWNGKLYNEARKIMGAMVQIITYRDFLPLVLGPTAMRKYLPITYRSYNDSDV | 487 |
| PXDN | AGIFNAFATAAERFHTLVNPLLYRLDENFQIAQ--DHLPLHKAFTSPFRIVNEGGIDPLLRGLFGVAGRWVPSQLNTELTERLSMAHTY-ALDLAAINIQGRDGHGIPPYHYDYRVYQNLISA | 1181 |
| TPO | PTVSNVFSTAAFRFGHATHPLVRLDASQEHDDPLGLWLHQAFSPWTLRGGGLDPIRIGLLARPAKLOVQDQMLNDELTERLFLVLSNS-S-TLDLAINIQGRDHLGPGYNEWREHFCGLPR | 602 |
| LPO | PRISNVFT--FAFRFGHLEVPSSMFRLDENYQWGPPEPELPLDHLFNTMWRKDDGGIDPLVFRGKLMKQNMWTEGKLNKLFOPHRRIGHGFLAAINIQGRDHDGQPGYNSWRAFCDLISQ | 577 |
| EPX | PRVANVFT--LAFRFGHTMLQPFMFRLDSQYRASAPNSHPVLSAFAWRVYEVGGIDPLRGLMATPKALNQDAMVDELDRDLFRQVRR-I-GDLAALAINQGRSDHGLGPGYNARRHFCGLISQ | 582 |
| MPO | PRVANVFT--NAFRFGHTLIQPFMFRLDNRYQPMPEPRVLSRVFASWVLEGGIDPLRGLMATPKALNQDAMVDELDRDLFRQVRR-I-GDLPALAINQGRSDHGLGPGYNARRHFCGLFQ | 610 |
| PXDN | AHTFEDLKNIEKNPEIREKLRKLYGSTLNIDLFPALVVEDLVPGSRLGPTLMQLLSLTOFKRLRDGRLWYENPGVFSQAOLTOIKOTSLARIICDADNADNITRYQSDVFRVAEFPFHGYSQDEIPIR | 1306 |
| TPO | LETPADLSTAIASRSVADKILDIYKHPDNIDVWLGGLAENFLFRARTGFLFACILIGKQKALRQDGFWVENSHVFTDAQRELEKHSLSRVCIDNTGLITRVPM-DAFQVQKPEDEFESQDSITG | 726 |
| LPO | PQTELELNTVLRKSMKAKKLLGLYGTDPNDIDIWIGATAEPLVERGRVGPILLACLLGKQFOIQIDGDRFWVENPGVFTNEQKDSLOKMSFRLVCDNTRITKVPFR-DPFWANSYFYDFVDCSADIK | 701 |
| EPX | PRNLAQLSRVLKNQDLARKFLNLYGTPDNIDIWIGATAEPLPFGARVGPILLACILENQFRARDDGRFVWQKRGVTKRQKALSRLISLSRIICDNTGITTVSR-DIFRANIYPRGFVNGSRIPR | 706 |
| MPO | PETVQGLTVLRLNKLARKLMEQYGTFNNDIWMGGVSEPLKRRKRGVGPILLACILIGTQFRKLRDGRFWVENEGVFSMOQRALAQIISLPRIICDNTGITTVSKNIFMNSYPRDFVNCSTLIPA | 735 |
| PXDN | VDLRVWQDDETRGQFNA-----FSYHFRGRSSEFSYQEDRPTKTR-----PRKI PSVG--RQGEHLNSSTSAFSTRSDASGTNDTREFVLEMQKTTIDLRTQIKKLESRLST | 1412 |
| TPO | MNLEAWRETFPQDDKGFPEVNGDFVHCEESRRVIVYSCRHGYELQREGQITCTQEGWDFQPLPKDYNECADGAHPCHASAR-CRNTK---GGFQCLCAD-----PYELGDDG | 835 |
| LPO | LDLSPWASVKN----- | 712 |
| EPX | LNLASWRGT----- | 715 |
| MPO | LNLASWREAS----- | 745 |

28. ábra: A fehérjeláncon belül diszulfidhidat nem képző ciszteinek azonosítása a PXDN peroxidáz doménjében. Többszörös szekvenciaillesztéssel kapott eredményeink alapján a humán hem-peroxidázok 14 erősen konzervált ciszteinen osztoznak (fekete kerettel jelölve), melyek a proMPO-ban és LPO-ban a peroxidáz domén harmadlagos szerkezetének kialakításához járulnak hozzá. A PXDN ezen régiója további négy olyan ciszteint tartalmaz a 736., 1315., 1316. és 1319. pozíciókban (sárga és szürke kiemeléssel jelölve), amelyek hozzájárulhatnak a homotrimer alegységeit összetartó diszulfidhidak kialakításához. A * konzervált reziduomot, a : pedig hasonló kémiai szerkezetű aminosavakat jelöl.

A PXDN homotrimert összetartó kötéseket csak a monomeren belüli diszulfidhidak kialakítása után is szabadon maradó ciszteinek biztosíthatják. A szekvenciaillesztés által kijelölt, egymással feltehetően fehérjeláncon belüli kötéseket képző 14 cisztein reziduumon kívül további 4 olyan cisztein is szerepel a vizsgált PXDN régió 736., 1315., 1316. és 1319. pozícióiban, amelyek hiányoznak a többi hem-peroxidáz szekvenciájából (28. ábra). Azt feltételeztük, hogy ezek a ciszteinek kiemelt jelentőséggel bírhatnak a humán PXDN oligomerizációjának folyamatában, ezért lehetséges szerepüket további kísérletekben elemeztük.

6.2.4.2. A fehérjeláncon belül diszulfidhidat nem képző ciszteinek közreműködésének vizsgálata a PXDN oligomerformálásában

Megvizsgáltuk, hogy a humán PXDN szekvencia 736., 1315., 1316. és 1319. pozícióiban található ciszteinek milyen egyedi jelentőséggel bírnak a PXDN trimer kialakításában, ezért helyspecifikus mutagenezissel különböző kombinációkban egyszeres (C736S; C1315S; C1316S; C1319S) és többszörös (C1315S, C1316S; C1315S, C1319S; C1316S, C1319S; C1315S, C1316S, C1319S; C736S, C1315S) cisztein-szerin mutáns konstruktokat hoztunk létre (29.A ábra), majd azok oligomerizációs képességét HEK293FS sejtek tranziens transzfekcióját követően vizsgáltuk. A sejtlyázumokból készült Western blotok alapján az 1316. és 1319. ciszteinek külön és együttes mutációja sem befolyásolta a rekombináns PXDN oligomerképzését. Ezzel szemben C736S és a C1315S konstruktok esetében a magas molekulatömegű komplex eltűnt, és a monomer mellett dimernek megfelelő magasság környékén kaptunk erős jeleket. Az 1315. és az 1319. cisztein elrontása esetén az eddig megfigyelt oligomer formák fölött is detektáltunk további PXDN-specifikus csíkokat. Elképzelhető, hogy az említett, módosult szerkezetű mutáns konstruktok egy ezidáig ismeretlen chaperonnal történő kapcsolódása állhat az új fehérjesávok megjelenésének hátterében, ezt a kérdést azonban munkacsoportunk nem vizsgálta a továbbiakban. A C736S, C1315S konstruktkban az érintett ciszteinek együttes hiánya az oligomerképzés teljes elmaradásához vezetett, ami arra utal, hogy ez a két aminosav lehet felelős a homotrimert összetartó diszulfidkötések létesítéséért.

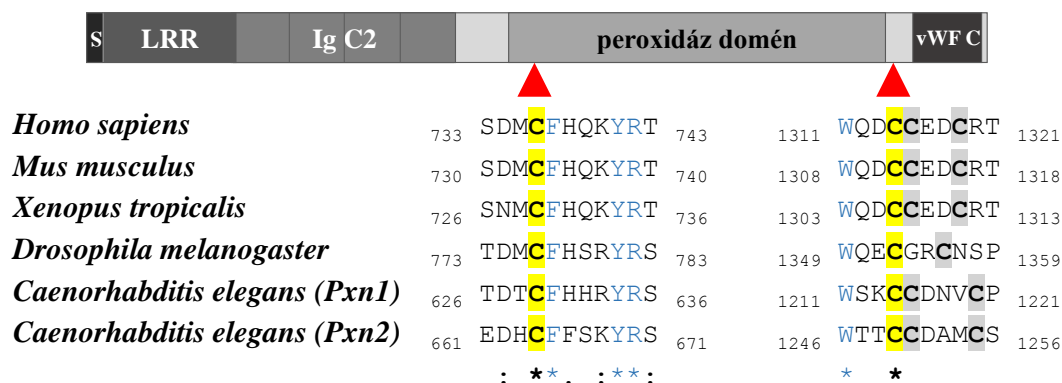


29. ábra: A 736., 1315., 1316. és 1319. ciszteinek szerepének vizsgálata a PXDN trimerizációjában. A PXDN 696. and 1412. aminosava közötti szakaszán található, intradomén diszulfidhidakat nem alkotó ciszteineket több kombinációban szerinre cseréltük (A), majd az így létrehozott mutánsokat HEK293 sejtekben fejeztük ki. A β -merkaptóetanolt (β ME) nem kapott sejt-lizátumok V5-öt felismerő antitesttel végzett Western blot analízise alapján a Cys1316 és Cys1319 egyedüli vagy együttes mutációja sem akadályozta meg a trimerizációs folyamatot, amíg a Cys736 vagy Cys1315 hiányában a fehérje csak dimer kialakítására volt képes. A Cys736 és Cys1315, valamint a Cys1315, Cys1316 és Cys1319 szimultán rontása esetében a PXDN csak monomer formában volt detektálható a sejt-lizátumban (B).

Az oligomerizáció szempontjából jelentősnek tűnő 736. és 1315. ciszteinek közül csak az egyiket érintő, egyszeres vagy kétszeres mutációt hordozó konstruktok minden esetben erős jeleket adtak a dimernek megfelelő magasságokban. Ez azt valószínűsíti, hogy a C-terminálisan megmaradó ciszteinek részvételével úgynevezett erőltetett („forced”) dimerek alakulhatnak ki, amelyek azonban nem képesek visszaállítani a domináns cisztein hiányában károsodott oligomerizációs folyamatot. Ezt a feltevést támogatja az a megfigyelés is, hogy a C736S, C1315S dupla mutánshoz hasonlóan a C1315S, C1316S, C1319S konstruktt esetében is csak monomer PXDN-t detektáltunk a tranziensen transzfektált HEK293FS sejtek lizátumában (29.B ábra).

6.2.4.3. A trimerizációban résztvevő ciszteinek konzerváltságának vizsgálata fajok közötti homológia kereséssel

A *Drosophila* PXDN trimer formáját leíró irodalmi adatok⁷⁶ és saját, az egér és humán fehérje negyedleges szerkezetének vizsgálata során kapott eredményeink egybeesése azt sugallja, hogy a PXDN oligomerizációja az élővilág különböző szintjein igen hasonló módon, konzervált aminosavrégiók részvételével mehet végbe. Ennek alátámasztására az említett három fajban, valamint *Xenopus tropicalis*ban és *Caenorhabditis elegans*ban expresszálandó PXDN formák aminosavsorrendjét többszörös szekvenciaillesztéssel hasonlítottuk össze, különös tekintettel a humán fehérje 736. és 1315. pozíciójának megfelelő aminosavakra és az azokat körülvevő régiókra. Az elemzett hat szekvencia több szakaszon is homológnak bizonyult egymással, az azonos és hasonló kémiai jellegű aminosavak kiemelkedően nagy arányával a peroxidáz doménnek megfelelő régióban. A humán PXDN trimerizációjáért felelős két ciszteint a többi vizsgált fajban is konzervált pozícióban, és több esetben igen hasonló aminosav-környezetben találtuk (30. ábra). Ez támogatja feltételezésünket, mely szerint a PXDN trimerformálása a vizsgált fajok között megőrzött mechanizmussal, a humán szekvencia 736. és 1315. ciszteinjeinek megfelelő reziduumokon keresztül valósulhat meg.



30. ábra: A humán PXDN homotrimert stabilizáló ciszteinek fajok közötti konzerváltságának vizsgálata. A 736. és 1315. ciszteinek megfelelői az élővilág igen eltérő fejlettségi fokán álló organizmusok PXDN szekvenciáiban is konzervált pozícióban és aminosavkörnyezetben találhatóak. A * konzervált reziduomot, a : pedig hasonló kémiai szerkezetű aminosavakat jelöl.

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy mind az endogén, mind a rekombináns emlős PXDN homotrimer formába rendeződik, ami annak domináns megjelenési formáját jelenti. A komplexet kialakító alegységek asszociációja és összekapcsolása a fehérje endogén enzimaktivitásától független módon történik. A trimer forma a peroxidáz doméntól az α -helikális régió végéig húzódó szakasz közreműködésével megy végbe, stabilitását pedig két, a humán szekvenciában 736. és 1315. pozíciót elfoglaló cisztein által kialakított intermolekuláris diszulfidhidak biztosítják. Az említett cisztein reziduomok erős evolúciós konzerváltsága arra utal, hogy a trimerképzés humán fehérje esetében felderített folyamata az állatvilág számos szintjén univerzális mechanizmussal mehet végbe.

6.3. Az ismert PXDN funkciók szerkezeti követelményeinek vizsgálata

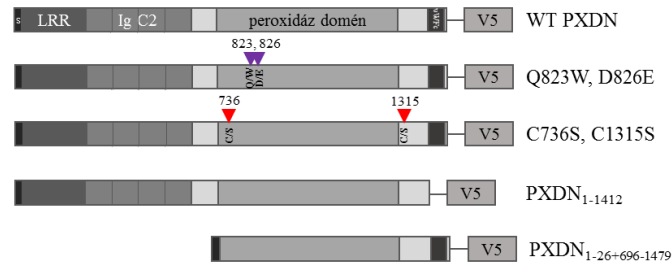
A sejtek és szövetek széles körében kifejeződő PXDN a hem-peroxidázok és ECM fehérjék szerkezeti jellegzetességét hordozó, ennek következményeképpen pedig egyszerre többféle, egymástól akár független funkció ellátására is alkalmas fehérje. Azon túlmenően, hogy szekrécióját követően képes az extracelluláris térben aktív peroxidázként működni és ezáltal eddigi egyetlen ismert fiziológiás szubsztrátjának, a

kollagén IV alegységeknek az oxidatív keresztkötését katalizálni,⁴⁴ ECM motívumai segítségével adhezív szerepet is betölthet a bazális membrán egyes elemei, illetve az azokhoz kapcsolódó sejtek között. Az itt bemutatott kísérletekben az említett funkciók szerkezeti feltételeit igyekeztünk feltárni a már ismertetett rekombináns humán PXDN konstruktok segítségével, különös tekintettel a peroxidáz doménon kívül eső szerkezeti elemek és a trimer forma megtartottságának jelentőségére az adott folyamatban.

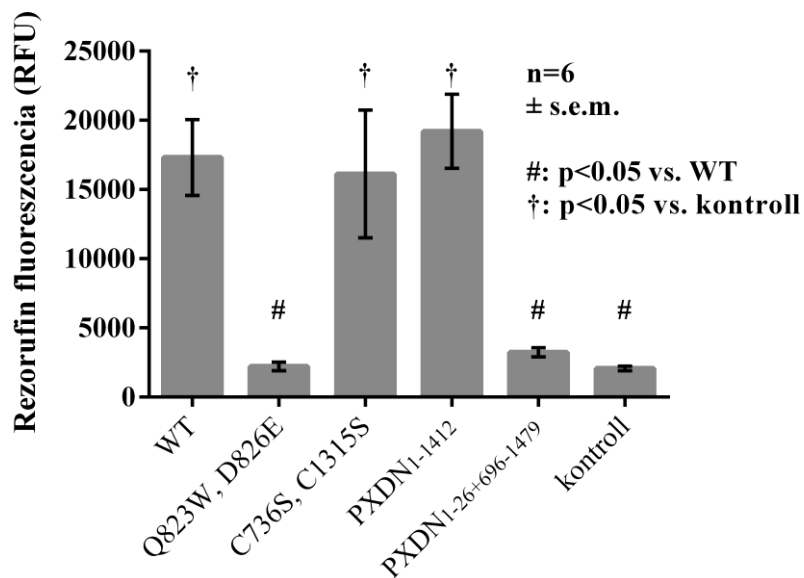
6.3.1. A PXDN *in vitro* peroxidázaktivitásának szerkezetfüggése

A PXDN strukturális jellemzői és enzimaktivitása közötti összefüggést első megközelítésben Cos7 sejtekben kifejezett rekombináns PXDN konstruktok (31.A ábra) enzimaktivitásának Amplex Red peroxidáz assay-ben történő összevetésével vizsgáltuk. A vad típusú humán PXDN-t tartalmazó sejtizátumok az üres, vagy a bizonyítottan enzimaktivitás-hiányos Q823W, D826E konstrukttal transzfektált kontroll sejtekhez képest jelentős peroxidázaktivitást mutattak, melynek nagyságát sem a homotrimer formálás szempontjából elengedhetetlen, 736. és 1315. pozíciójú ciszteineket együttesen érintő mutációk, sem a vWF C domén hiánya nem befolyásolta számottevően. Ezzel szemben az LRR és Ig C2 doméneket sem tartalmazó PXDN konstrukttal nem rendelkező mérhető peroxidázaktivitással, ami feltételezéseink szerint a katalitikus domén drasztikus N-terminális trunkálás következtében kialakult, hibás foldingjára vezethető vissza (31.B ábra). Mérésünkben a PXDN mesterséges Amplex Red peroxidáz szubsztráttal szemben mutatott enzimaktivitása tehát egyedül a hem csoport kötésétől, valamint a peroxidáz domén katalitikus aktivitását biztosító másodlagos és harmadlagos struktúra megtartottságától függött, amihez vélhetően szükséges az utolsó immunglobulin C2 motívumot a peroxidáz doménnel összekötő, interdomén régió egy részének jelenléte is a molekulában.

A



B



31. ábra: A PXDN *in vitro* peroxidázaktivitásához szükséges strukturális feltételek vizsgálata. Az eltérő szerkezetű PXDN konstruktok (A) enzimaktivitását Amplex Red peroxidáz assay-ben hasonlítottuk össze, amihez azonos mennyiségű DNS-sel transzfektált Cos7 sejtek lizátumait használtuk fel. A monomer C736S, C1315S és a vWF C-hiányos PXDN₁₋₁₄₁₂ konstruktok a vad típusú (WT) fehérjével azonos aktivitást mutattak a mérés során. Ezzel szemben a hem kötésére alkalmatlan, funkcióvesztéses Q823W, D826E és az N-terminálisan trunkált PXDN₁₋₂₆₊₆₉₆₋₁₄₇₉ mutáns nem rendelkezett a kontroll sejtektől eltérő, mérhető peroxidázaktivitással. (B, n=6 ± s.e.m.; #: p<0.05 vs. WT, †: p<0.05 vs. kontroll).

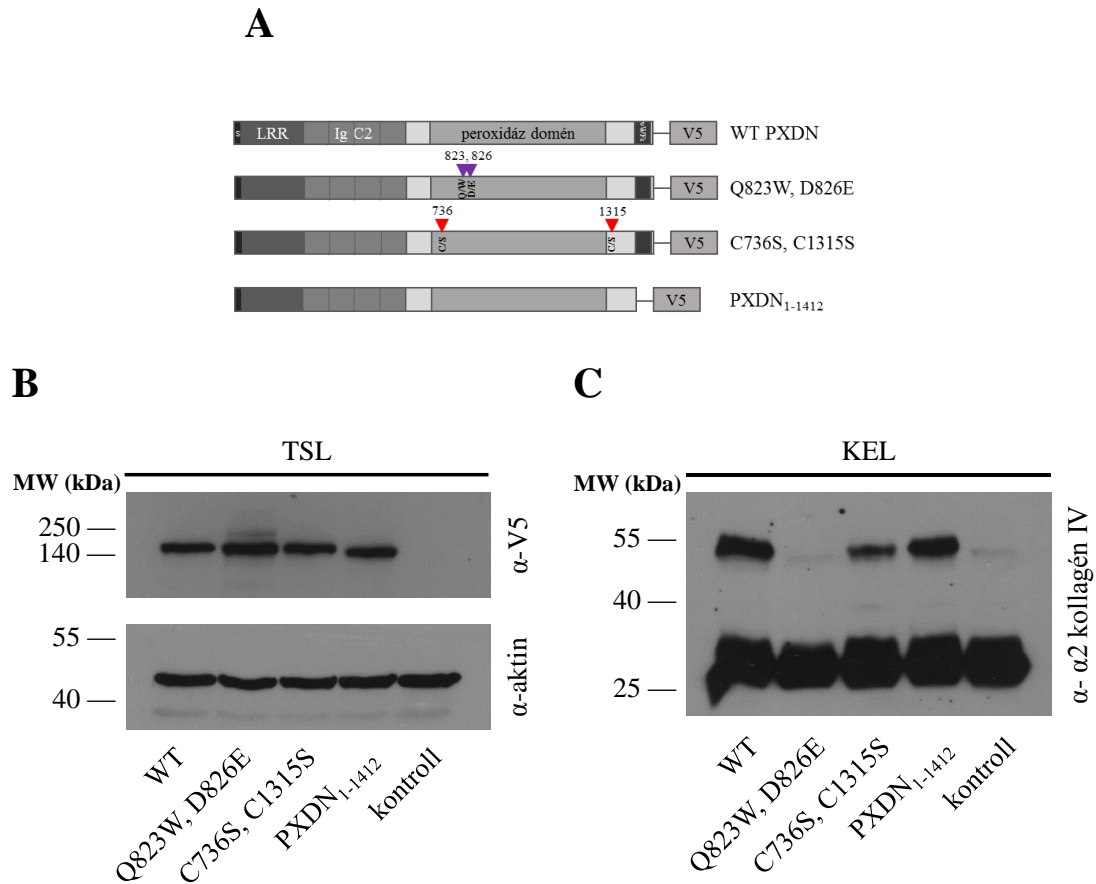
6.3.2. A PXDN kollagén IV keresztkötő aktivitásának strukturális feltételei

Munkánk kezdetén élő szövetből izolált primer MEF sejtek felhasználásával bizonyítottuk, hogy az endogén emlős PXDN képes az ECM-ben található kollagén IV molekulák NC1 doménjeinek keresztkötését katalizálni. A fiziológias szubsztrát módosítására irányuló folyamat tanulmányozására hasznos eszköznek bizonyultak a PXDN-deficiens MEF sejtek, amelyeket funkciómentő („rescue”) kísérletekhez használtunk fel. Ezek során vad típusú és mutáns PXDN konstruktokat (32.A ábra) juttattunk vissza a sejtekbe, majd azt vizsgáltuk, hogy azok milyen mértékben képesek a hiányzó kollagén IV keresztkötési működés helyreállítására.

A transzfekciót követően 24 órával feltárt sejtenyészetek a vizsgált rekombináns fehérjék közel azonos mennyiségét expresszálták a V5-tag-et felismerő antitesttel készült és aktin töltéskontrollal kiegészített Western blot alapján (32.B ábra). A kollagén IV keresztkötés mértékét 72 órás inkubációt követően a sejtek kollagenázzal emésztett lizátumainak Western blot analízisével, a kialakuló NC1 dimereknek megfelelő magasságban α 2-specifikus kollagén IV antitesttel kapott jel erőssége alapján hasonlítottuk össze. A vad típusú és a vWF C domén nélküli konstruktok hatékonyan állították helyre a knockout MEF hiányzó kollagén IV keresztkötési képességét, amíg a peroxidázaktivitással nem rendelkező, Q823W, D826E mutáns PXDN-t kifejező sejtek lizátumában a kontroll sejtekhez hasonlóan nem tudtunk NC1 dimereket kimutatni. A trimerforma létrehozására alkalmatlan C736S, C1315S fehérje ugyan megtartotta kollagén IV keresztkötő képességét, de jelentősen kisebb mennyiségű NC1 dimer kialakulását katalizálta, mint a WT és a PXDN₁₋₁₄₁₂ fehérjeformák (32.C ábra).

Funkciómentő kísérleti felállásunkban tehát az endogén PXDN esetében farmakológiai megközelítéssel kapott eredményt a rekombináns fehérje peroxidázaktivitásának célzott elrontásával is megerősítettük, melyek alapján az emlős PXDN enzimaktivitása esszenciális a kollagén IV NC1 dimerek kialakításához. A C-terminálisan trunkált PXDN konstrukt vad típusnak megfelelő keresztkötési aktivitása alapján a ciszteinekben gazdag vWF C domén vélhetően nem vesz részt a folyamathoz szükséges molekuláris interakciók kialakításában. Az Amplex Red peroxidáz mérésben a trimert formáló konstruktokkal egyenlő aktivitásúnak bizonyult monomer PXDN forma alacsony kollagén IV keresztkötő hatékonysága a trimer negyedleges szerkezet

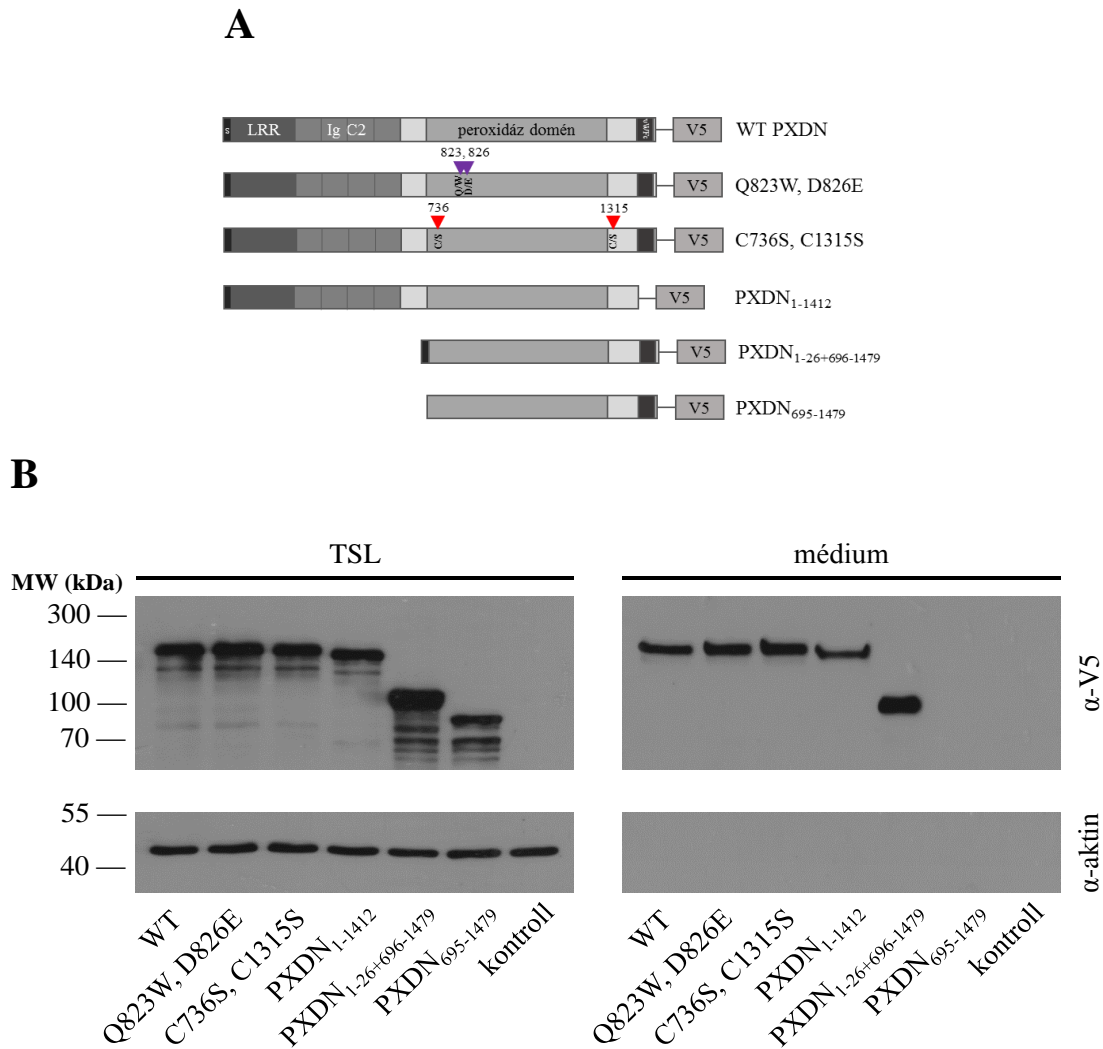
jelentőségére utal a PXDN és a kollagén IV közötti molekuláris kapcsolat kialakulása során.



32. ábra: Rekombináns PXDN konstruktok kollagén IV keresztükötő képességének tesztelése. A kollagén IV NC1 dimerek kovalens keresztükötését katalizáló reakció vizsgálatához PXDN-deficiens MEF sejtekben fejeztük ki a kiválasztott PXDN konstruktokat (A). Az egyenletes transzfekciós hatékonyságot a teljes sejtlizátumokból (TSL) készült Western blotban a rekombináns fehérjék C-terminálisához kapcsolt V5-tag kimutatásával igazoltuk (B). A kollagenázzal kezelt lizátumok (KEL) analízise során az α - α 2-kollagén IV antitesttel előhívott blotokon 55 kDa-nál megjelenő szignál alapján értékeltük a kollagén IV protomerek keresztükötöttségének változását. Amíg a funkcióvesztéses Q823W, D826E mutáns kifejező sejtek lizátumában nem detektáltunk az NC1 dimerekhez köthető jelet, a WT, PXDN₁₋₁₄₁₂ és C736S, C1315S konstruktok egyaránt képesnek bizonyultak a PXDN KO sejtekben hiányzó kollagén IV keresztükötési funkció helyreállítására, az utóbbi fehérje esetében azonban kisebb hatékonyságot tapasztaltunk a másik kettő szekvenciával történő összehasonításban (C).

6.3.3. A PXDN szekréciónak szekvenciakövetelményei

A PXDN szekréciónak esszenciális molekularészletek azonosításához módosított szerkezetű PXDN konstrukttal (33.A ábra) transzfektáltunk Cos7 sejteket, majd felülűszójuk PXDN tartalmát Western blotban, a rekombináns fehérjék C-terminális V5-tag-ét felismerő antitest segítségével hasonlítottuk össze. A sejtek lizátumából készült Western blot a vizsgált rekombináns konstrukttal közel egyenletes transzfekciós hatékonyságát támasztotta alá aktin töltéskontroll alkalmazása mellett (33.B ábra, bal panel). A módosított szerkezetű PXDN konstrukttal közül négy a vad típusú fehérjével összemérhető mennyiségben jelent meg a sejtenyésző médiumban is. A peroxidázaktivitást megszüntető Q823W, D826E és a homotrimer kialakulását meggátoló C736,1315S pontmutációk egyike sem akadályozta meg a fehérje szekréciónak, és az LRR, Ig C2 és vWF C domének hiánya sem befolyásolta azt. A rekombináns PXDN formák közül egyedül az N-terminálisan trunkált PXDN₆₉₅₋₁₄₇₉-et nem tudtuk kimutatni a transzfektált sejtek felülűszójában, amelyből a többi tesztelt konstrukttal szemben hiányzott a humán PXDN első 26 aminosavából álló szignál szekvencia. Ennek kizárására, hogy a médium PXDN tartalma felűszott sejtekből vagy sejtörmeléből származott, kontroll Western blotban ellenőriztük a felülűszó minták aktin tartalmát, amelyek egyikében sem detektáltunk specifikus jelet az előhívás során (33.B ábra, jobb panel). Eredményeink arra utalnak, hogy a szignál szekvencia megléte szükséges és elégséges feltétele a PXDN extracelluláris térbe történő szekréciónak.

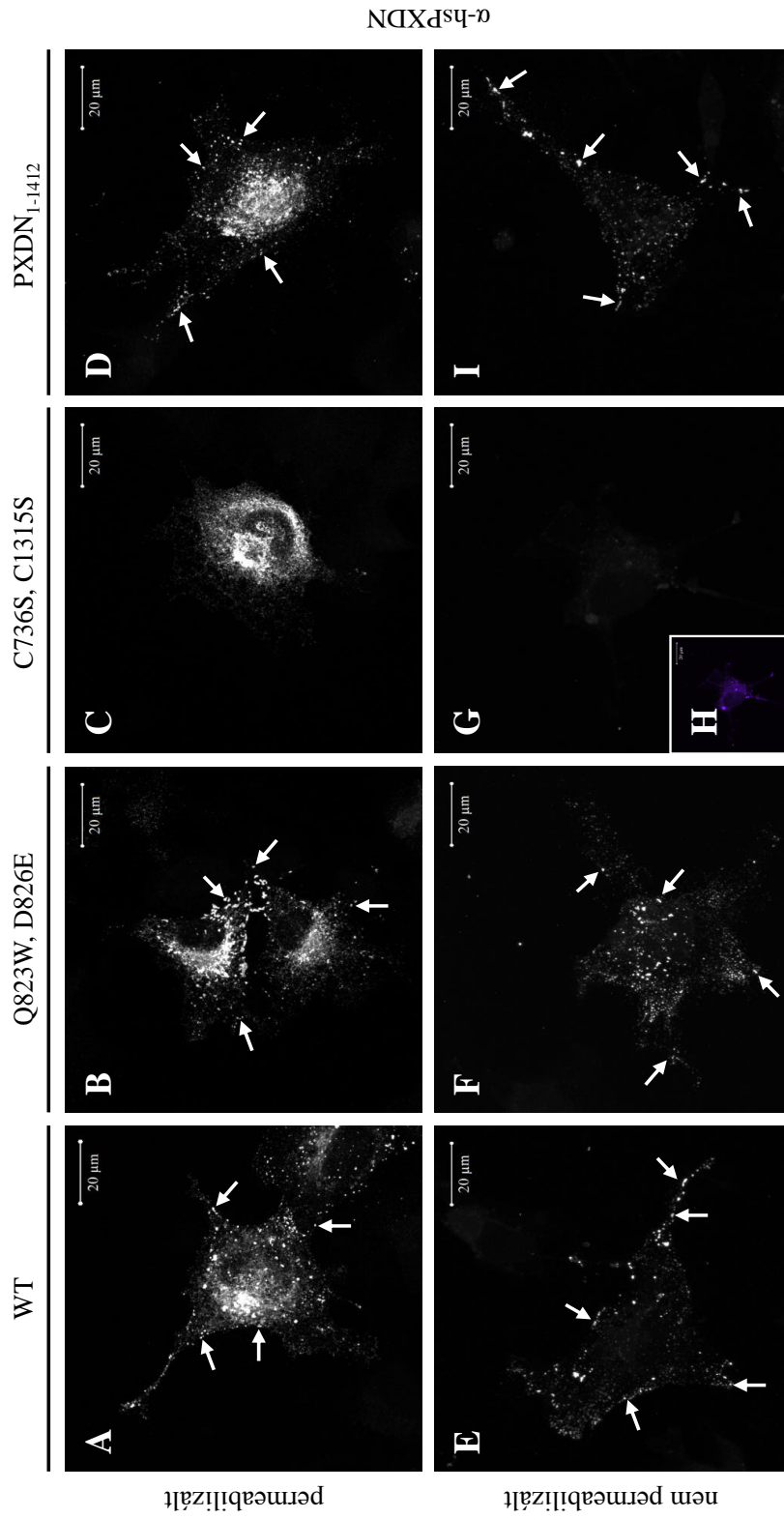


33. ábra: A PXDN szekréciójához szükséges aminosavrégiók azonosítása. A mutáns és doménhiányos konstrukciókkal (A) transzfektált Cos7 sejtek felülészóiban megjelenő PXDN kimutatása alapján határoztuk meg a fehérje szekréciója szempontjából esszenciális szekvenciaszakaszok helyzetét. A teljes sejtizlátumok (TSL) Western blot vizsgálata során kapott V5-specifikus jel alapján a konstrukciók közel azonos mértékben expresszálódtak a sejtekben (B), a médiumban azonban csak azok a PXDN formák jelentek meg, amelyek részét képezte a teljes hosszúságú fehérje első 26 aminosavából álló szekréciós szignál szekvencia is (B).

6.3.4. Rekombináns PXDN konstruktok szubcelluláris elhelyezkedésének összehasonlítása

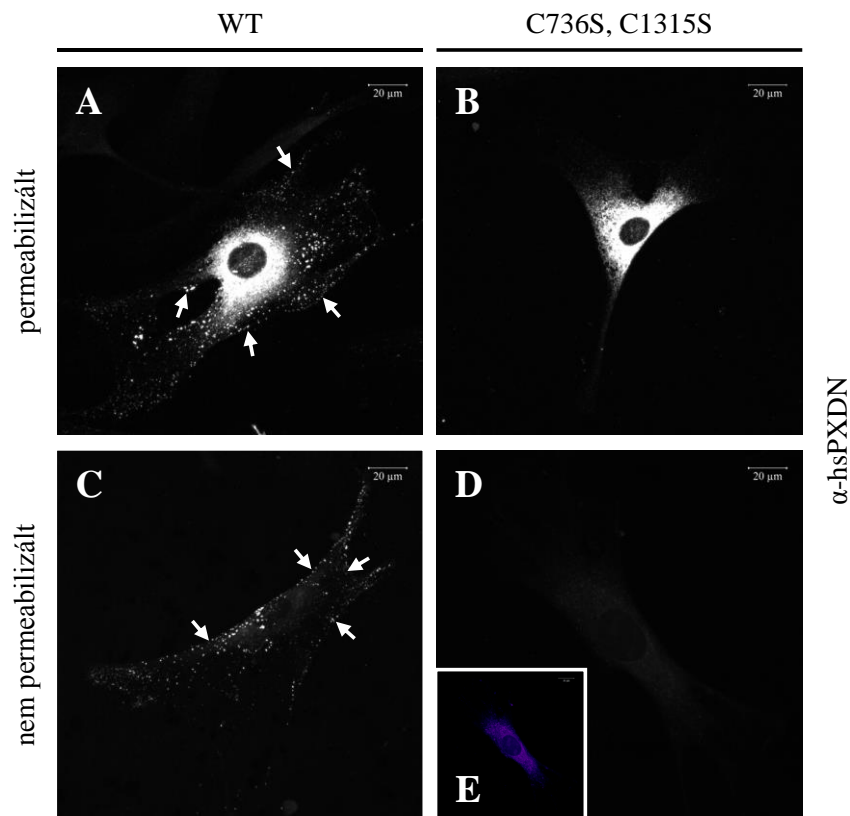
A vad típusú PXDN és a monomer formájú C736S, C1315S mutáns kollagén IV keresztkötési vizsgálatban mutatott eltérő hatékonyságának lehetséges okát a rekombináns konstruktok heterológ expressziós rendszerben mutatott lokalizációjának vizsgálatával kívántuk felderíteni.

A Cos7 sejtekben kifejezett, módosított PXDN formák elhelyezkedését fixált mintákon, a fehérje C-terminálisát felismerő, poliklonális antitesttel kapott festődési kép alapján azonosítottuk. A heterológ expressziós rendszerben kifejezett vad típusú fehérje esetében is megfigyeltük a korábban már több, endogén PXDN-t expresszáló sejttypusnál leírt prominens endoplazmás retikulum (ER) festődést (*34.A ábra*), ami az összes vizsgált konstrukttal megjelent a transzfektált sejtek permeabilizált mintáin (*34.A-D ábra*). Az endoplazmás retikulum lokalizáció mellett a vad típusú (*34.A ábra*), Q823W, D826E (*34.B ábra*) és PXDN₁₋₁₄₁₂ (*34.D ábra*) fehérjék a plazmamembrán mellett elszórt, granuláris jellegű struktúrákban is intenzíven jelölődtek. Az intra- és extracelluláris szignálok elkülönítése érdekében az immunfestést nem permeabilizált mintákon is megismételtük. Az endoplazmás retikulumhoz asszociált szignáloktól eltérően a sejtmembrán lefutásának mentén elhelyezkedő, pontszerű jelölődések a nem permeabilizált mintákban is megmaradtak, ami alátámasztotta azok sejten kívüli lokalizációját (*34.E ábra*). Amíg a vWF C domén hiányában, illetve a peroxidázaktivitást érintő mutációk mellett a vad típusú fehérjénél megfigyelt mindkét domináns lokalizációban megjelent a módosított szerkezetű fehérje (*34.F,G,I ábra*), addig a monomer C736S,C1315S konstrukttal expresszáló Cos7 sejtek nem permeabilizált mintáiban nem tudtunk PXDN-specifikus jelet detektálni (*34.G ábra*) annak ellenére sem, hogy az intakt sejtek jelenlétét minden vizsgált látótérben alszínés LUT megjelenítéssel igazoltuk (*34.H ábra*).



34. ábra: A PXDN szubcelluláris lokalizációját meghatározó szerkezeti jellemzők vizsgálata. A Cos7 sejten kifejezett, módosított szekvenciájú rekombináns PXDN konstruktok sejten belüli elhelyezkedését a fehérje C-terminálisát felismerő poliklonális nyúl antitest segítségével mutattuk ki. Az összes vizsgált konstruktt esetében megfigyelhető domináns endoplazmás retikulum lokalizáció mellett (A-D) a WT (A), Q823W, D826E (B) és PXDN₁₋₁₄₁₂ (D) fehérjéket a plazmamembrán mentén elszórtan elhelyezkedő pontokban is detektáltuk (fehér nyílakkal jelölve) a permeabilizált mintákban, a C736S, C1315S konstruktt azonban nem jelent meg ezekben a képletekben (C). A nem permeabilizált sejtek immunfestése során a membrán menti pontoszerű struktúrák továbbra is intenzíven jelölődtek (E, F, I, fehér nyílakkal jelölve), alátámasztva azok sejten kívüli elhelyezkedését. A C736S, C1315S fehérjéhez köthető festődést a Cos7 sejtek permeabilizálatlan mintáiban nem tudtunk kimutatni (G), habár intakt sejtek jelenlétét álszínes LUT megjelenítéssel minden vizsgált látótérben igazoltuk (H). A skála 20 μm-t jelöl.

A vad típusú és monomer PXDN konstrukt eltérő lokalizációját más rendszerben is meg kívántuk erősíteni, ezért azokat PXDN-hiányos egérből származó primer fibroblasztokban is kifejeztük. A permeabilizált mintákat a Cos7 sejteknél is alkalmazott PXDN antitesttel festve egyidejű endoplazmás retikulum és plazmamembrán-asszociált jelölődést csak a vad típusú fehérje esetében tapasztaltunk (35.A ábra), amíg a C736S, C1315S konstruktot expresszáló sejtekben a PXDN festődés az endoplazmás retikulumra korlátozódott (35.B ábra). Előzetes permeabilizálás hiányában a vad típusú konstruktnak csak a pontszerűen elhelyezkedő extracelluláris frakciója maradt elérhető az antitest számára (35.C ábra), a C736S, C1315S mutáns expresszáló mintákban pedig nem kaptunk specifikus jelölődést (35.D ábra), így ebben az esetben is LUT megjelenítést



35. ábra: A PXDN kettős lokalizációjának detektálása tranziensen transzfektált PXDN-hiányos MEF sejtekben. A WT (A, C) és C736S, C1315S (B, D) PXDN konstruktokat kifejező, permeabilizált MEF sejtek összehasonlítása során a mindkét mintában megfigyelhető erős endoplazmás retikulum jelölődés mellett (A, B) a vad típusú minta esetében a sejtmembrán lefutása mentén is finoman szemcsézett festődést észleltünk (A) fehér nyilakkal jelölve) a PXDN-specifikus antitesttel végzett immunfestésben. A homotrimer PXDN-t tartalmazó pontszerű struktúrák a sejtek permeabilizálása nélkül is megjelentek a festés során (C), a monomer forma esetében azonban egyáltalán nem detektálunk a sejt felszínhez asszociáló extracelluláris frakciót (D). A sejtek jelenlétét ebben az esetben is LUT megjelenítéssel igazoltuk (E). A skála 20 μ m-t jelöl.

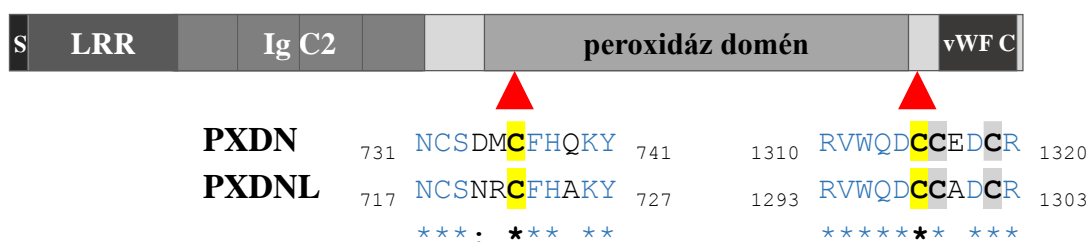
használtunk a sejtek jelenlétének igazolására (35.E ábra). A kapott eredmények alátámasztására a kísérleteket a C-terminális V5-tag kimutatására alkalmas antitesttel is megismételtük, amivel mind a Cos7, mind a PXDN-hiányos MEF sejtek esetében a bemutatott mikroszkópos képeken látottak megfelelő festődési mintázatot tapasztaltunk.

6.4. A PXDNL szerkezeti jellemzőinek és lokalizációjának vizsgálata

A PXDNL a PXDN szívspecifikusan expresszáldó, peroxidáz-funkcióvesztéses homológja. A két fehérje aminosavszekvenciája 61%-ban azonos és további 13%-ban hasonló, és doménszerkezetük is megfeleltethető egymásnak. Kollégám, Dr. Péterfi Zsolt PhD értekezésében bemutatta, hogy a rekombináns PXDNL magas molekulatömegű komplexek kialakításában vesz részt, valamint a PXDN-nel molekuláris interakcióba lépve képes annak *in vitro* peroxidázaktivitását antagonizálni. Ezeket a megfigyeléseket a fehérje szekvenciájának elemzésével, illetve a rekombináns forma lokalizációjának vizsgálatával kívántuk kiegészíteni.

6.4.1. A PXDN trimerizációjáért felelős ciszteinek konzerváltságának vizsgálata a PXDNL szekvenciájában

A PXDNL-t tartalmazó molekulakomplexek PXDN oligomerekhez igen hasonló látszólagos molekulatömege alapján felmerül annak a lehetősége, hogy azok szintén egy oligomerizációs folyamat köztes és végső állomásait jelentik. Ennek vizsgálatára, hogy a PXDNL-ben is adottak-e a trimerformálás PXDN esetében bizonyított strukturális feltételei, a két humán fehérje aminosavsorrendjét Clustal Omega szoftverrel analizáltuk és a PXDN 736. és 1315. pozíciójában található ciszteinjeinek konzerváltságát vizsgáltuk a két szekvencia között. A PXDNL-ben a 722. és 1298. helyen, igen hasonló aminosav-környezetben helyezkednek el az említett ciszteinek megfelelői (36. ábra), emellett pedig a szekvenciában szereplő összes többi cisztein is homológ pozícióban található a két fehérjében.



36. ábra: A PxDN és PxDNL szekvenciaillesztése az előbbi trimerizációját mediáló régióban. A 736. és 1315. ciszteinek megfelelői a PxDNL szekvenciájának 722. és 1298. pozíciójában, erősen konzervált aminosavkörnyezetben helyezkednek el. A * konzervált reziduumot, a : pedig hasonló szerkezetű aminosavakat jelöl a szekvenciában.

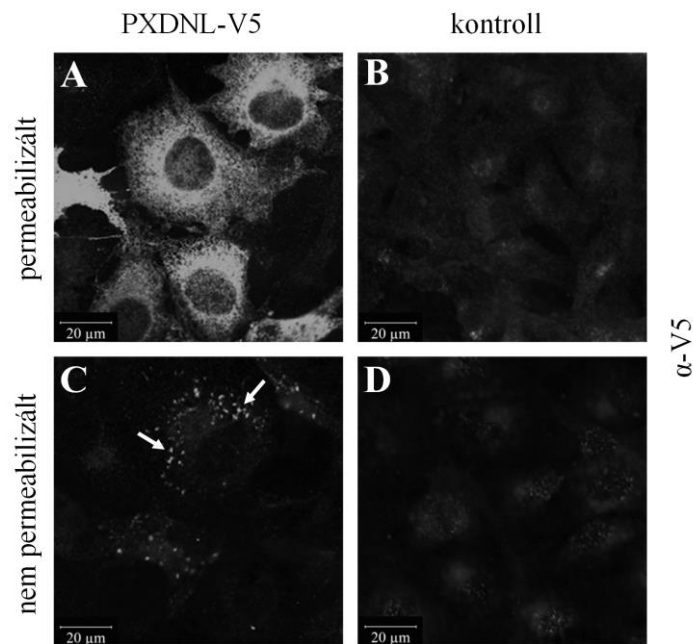
Ezek az adatok támogatják azt az elképzelést, mely szerint a PxDNL a PxDN-hez hasonló módon képezhet trimer formát, melynek stabilizálásáért az identikus pozícióban található 722. és 1298. ciszteineken keresztül kialakított diszulfidhidak lehetnek felelősek.

6.4.2. A rekombináns PxDNL lokalizációjának vizsgálata

Az endogén PxDNL lokalizációjának vizsgálata kardiomiocitákra korlátozódó expressziója, illetve megfelelő genetikai kontroll hiánya miatt komoly nehézségekbe ütközik. Munkacsoportunk saját készítésű, a fehérje C-terminálisát felismerő ellenanyagával végzett immunfestésében már korábban kimutatta a PxDNL-t indukált pluripotens őssejt eredetű kardiomiocitákban és szívizomból készült szövettani metszeteken is, azonban a részben endoplazmás retikulumra, részben a sejtek periferiájára lokalizálódó jel specificitását megfelelő kontroll hiányában nem tudta minden kétséget kizáróan igazolni. A PxDNL részletes karakterizálását tartalmazó közleményünk¹⁰² bírálata során a fehérje extracelluláris megjelenésével kapcsolatban merültek fel kérdések, amelyek tisztázása érdekében a rekombináns fehérje lokalizációjának jól kontrollálható és könnyen kivitelezhető vizsgálata mellett döntöttünk.

A PxDNL ECM-be történő szekrécióját és sejtfelszíni adhézióját rekombináns, V5-tag-gel ellátott konstrukt Cos7 sejtekbe történő transzfekcióját követően, a C-terminális tag-et felismerő antitesttel végzett immunfestésben vizsgáltuk. A sejten kívüli és belüli jelölődések elkülönítése érdekében az antitestek adását megelőzően detergens oldattal kezelt és anélkül feldolgozott mintákat hasonlítottunk össze. A PxDNL-t

expresszáló sejtek permeabilizált mintái erős, az endoplazmás retikulum rajzolatának megfelelő festődést mutattak (37.A ábra), amíg a kontroll sejtekben nem észleltünk fluoreszcens jelet (37.B ábra). A fehérjét kódoló konstrukttal transzfektált sejtek membránja mentén abban az esetben is megjelentek intenzíven festődő, pontszerű struktúrák (37.C ábra), ha az antitest adását megelőzően nem végeztünk permeabilizálást. Az extracellulárisan detektált szignál specificitását a kontroll sejtek nem permeabilizált mintáinak immunfestésével is igazoltuk (37.D ábra).



37. ábra: A rekombináns PXDNL-V5 elhelyezkedése Cos7 sejtekben. A sejteket PXDNL-V5-öt kódoló (A, C) vagy üres konstrukttal (B, D) transzfektáltuk, majd permeabilizálást követően (A, B) vagy anélkül (C, D) festettük őket V5 elleni antitesttel. A rekombináns konstruktot kifejező sejtek permeabilizált mintáiban kettős, az endoplazmás retikulum mellett a sejtmembrán mentén pontszerűen megjelenő szignált észleltünk (A), melyből permeabilizálás hiányában csak az utóbbi maradt detektálható (C, fehér nyilak). A kontroll sejtekben nem jelent meg specifikus festődés (B, D). A skála 20 µm-t jelöl.

Kísérleteink alátámasztják, hogy a rekombináns PXDNL heterológ expressziós rendszerben kettős elhelyezkedést mutat, és az endoplazmás retikulum mellett az extracelluláris térbe történő szekrécióját követően a sejt felszínen is megjelenik. A PXDNL szekvenciájával mutatott, annak trimerizációjáért felelős aminosavait is érintő nagymértékű hasonlóság igen valószínűvé teszi, hogy a PXDNL azonos mechanizmussal alakít ki három fehérjeegységből álló komplexet, ami sejt felszíni lokalizációja és a PXDNL-nel létrehozott molekuláris interakciója szempontjából is lényeges tényező lehet.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. Az emlős PXDN szerepe a kollagén IV hálózat kialakításában

Evolúciós vizsgálatok azt mutatják, hogy mind a PXDN fehérje szekvenciája, mind a kollagén IV NC1 doménjének szulfiliminkötésben érintett aminosavai erősen konzerváltak az élővilágban, és a Br⁻ ionok közreműködésével létrejövő interakciójuk ősi, a szöveti evolúció és szervfejlődés szempontjából esszenciális újítást jelentett.^{83,91} Az NC1 dimerek közötti kovalens keresztkötés jelenléte az *Eumetazoa* klád számos, egymástól igen távoli fejlettségi szinten álló tagjában igazolódott,⁹¹ azonban az endogén PXDN kollagén IV érést befolyásoló *in vivo* szerepét csak *Danio rerio*ban⁹¹ és *Drosophila melanogaster*ben igazolták ezidáig.⁴⁴ Az emlős PXDN funkciójáról igen korlátozott és a fiziológiától meglehetősen távoli rendszerekből származó ismeretekkel rendelkezünk. Az egér eredetű PFHR-9 embrionális karcinóma sejtvonal peroxidázgátlószeres kezelése,⁴⁴ illetve a rekombináns humán fehérje enzimaktivitásának vizsgálata⁸¹ ugyan értékes adatokat szolgáltatott a fehérje működésével kapcsolatban, azonban egyik megközelítés sem volt alkalmas az endogén emlős PXDN szöveti kollagén IV hálózat kialakításában betöltött élettani jelentőségének igazolására. Hogy a fiziológias körülményeket jobban modellező, de a PXDN-funkció befolyásolásának többféle technikai megközelítésére is lehetőséget nyújtó felállással dolgozhassunk, élő szöveti környezetből izolált primer sejtenyészeteket – köldökzsínór véna eredetű endotél sejteket (HUVEC) és egér embrionális fibroblasztokat (MEF) – használtunk fel vizsgálatainkhoz.

A primer sejtenyészetek kollagén IV hálózatának elemzésére az irodalomból megismert módszeren alapuló,⁴⁴ annál azonban részletesebb információt nyújtó eljárást fejlesztettünk. A mátrixba beépült, így intakt fehérjeként már nem mobilizálható kollagén IV molekulákból kollagenázzal szabadítottuk fel az NC1 doméneket, melyeket ezután Western blotban, izoforma-specifikus antitestek segítségével mutattunk ki. Az érzékeny ellenanyagoknak köszönhetően az eljárás segítségével már igen kevés sejtből kiindulva is képet kaptunk az ECM-ben kiépült kollagén IV hálózat összetételéről, illetve az NC1 domének keresztkötöttségi állapotáról. Az egyes szövetekben, illetve sejttípusokban azonosítható jellegzetes kollagén IV profilt a három ismert, $\alpha 1$ - $\alpha 1$ - $\alpha 2$, $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$ és $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ láncokból felépülő kollagén IV protomer eltérő eloszlása magyarázza,¹⁷⁰⁻¹⁷² amit

mind a hat ismert izoformát lefedő kollagén IV antitestpanelünk segítségével elemeztünk. A monomer és dimer NC1 domének az elektroforézist követően 25 és 55 kDa körüli magasságban jelennek meg az előhívás során. Az általunk használt monoklonális antitestek a szulfiliminkötésben érintett aminosavakhoz igen közeli NC1 szegmenseket ismernek fel, így felmerül annak a lehetősége, hogy a keresztkötött és szabad molekuláriszettel szemben eltérő affinitást mutatnak, ami miatt a különböző α -láncok keresztkötöttségének egymáshoz viszonyított mértékét nem tudtuk megbízhatóan megítélni. A különböző kezelések kollagén IV keresztkötésre kifejtett hatásait adott antitesttel a dimer és monomer NC1 domének magasságban kapott jel változásai alapján követtük nyomon.

A HUVEC tenyészetből készült fehérjemintákban az endotél sejtekre általánosan jellemző α_1 és α_2 izoformák mellett jelentősen kisebb intenzitással az α_5 kollagén lánc NC1 doménjét is sikerült kimutatnunk, azonban komplexképző partnerét, az α_6 izoformát nem. Ebből arra következtettünk, hogy a HUVEC bazális membránjának kollagén IV hálózata dominánsan α_1 és α_2 láncokból alkotott protomer alegységekből épül fel. Az endogén PXDN enzimaktivitásának szerepét a kollagén IV keresztkötésben egy, az orvosi gyakorlatban simaizomgörcsoldóként alkalmazott általános peroxidáz-gátlószer, a phloroglucinol segítségével vizsgáltuk, amely a *Drosophila* fehérje esetében már igen alacsony, 0,5 μ M-os koncentrációban is hatékony inhibitornak bizonyult.⁷⁶ A 48 órán át tartó kezelés nem befolyásolta a sejtekben kimutatható PXDN mennyiségét, a kollagén IV keresztkötöttségének mértékét azonban szignifikánsan csökkentette. Laborunk megrendelésére a SAGE Laboratories cink-ujjas endonukleáz (ZFN) technológia alkalmazásával PXDN-deficiens C57BL/6 egértörzset állított elő, amely az érintett egerek fenotípusának vizsgálatán túl vad típusú és PXDN-hiányos MEF sejtek izolálását is lehetővé tette. A HUVEC-hez hasonló primer sejtenyészetekben az egerekből izolált szövetmintákhoz képest kisebb háttérrel tudtuk vizsgálni a kiépülő bazális membrán kollagén IV hálózatának keresztkötöttségi állapotát, emellett a knockout MEF sejteket a későbbiekben a rekombináns PXDN konstrukciókkal végzett funkciómentő („rescue”) kísérleteinkben is felhasználtuk. A MEF lizátumokból felvett kollagén IV profil alapján a sejtek körül kiépülő ECM-ben az α_1 és α_2 láncok vannak jelen nagy mennyiségben. Amíg a vad típusú sejtekből származó minták dimer és monomer NC1 doméneket

egyaránt tartalmaztak, a PXDN-hiányos lizátumokban egyáltalán nem tudtuk a keresztkötött formát detektálni.

Az NC1 dimerképzés PXDN-deficiens MEF sejtekben tapasztalt teljes elmaradása valószínűtlenné teszi, hogy a PXDN hiányában más, kompenzatórikus mechanizmus pótolhatná a hiányzó kollagén IV keresztkötési reakciót. A PXDN definitív hiányával jellemezhető knockout MEF sejtekben, illetve a phloroglucinollal kezelt HUVEC sejtekben kapott eredmények azt támasztják alá, hogy a vizsgált sejtenyészetekben és vélhetően az izolálásukra felhasznált szövetekben fiziológias körülmények között is a PXDN enzimaktivitása felelős a bazális membránok kollagén IV protomerjeinek keresztkötéséért.

Az NC1 domének szulfiliminhidakon keresztüli kovalens összekapcsolása nem csak a kollagén IV hálózat mechanikai stabilitása szempontjából lehet lényeges tényező. A PXDN által katalizált reakció jelentősége felmerül a bazális membrán lokális pusztulása okán tüdővérzéssel és glomerulonefritisszel járó Goodpasture-szindróma kialakulásában.^{173,174} A betegekben autoantitestek és autoreaktív T-sejtek alakulnak ki az $\alpha 3$ lánc NC1 doménjeinek olyan szegmensei ellen, amelyek a szabályosan összerendeződött, stabil hexamer struktúrában nem hozzáférhetőek az immunrendszer számára.¹⁷⁵ A szintén glomerulonefritiszhez, illetve bizonyos esetekben hallásvesztéshez és szemészeti eltérésekhez vezető Alport-szindróma egyes változataiban az $\alpha 3$, $\alpha 4$ és $\alpha 5$ NC1 domének pontmutációk következtében megváltozott szerkezetét tartják kóroki tényezőnek,¹⁷⁶ ami közvetetten szintén befolyásolhatja a keresztkötés létrejöttét. Ismert, hogy a bazális membránokban a kollagén IV NC1 doménjeihez nagy mennyiségű heparin és heparán-szulfát proteoglikán kapcsolódik,^{177,178} melyek kötődését és következményes biológiai hatásait is módosíthatja az NC1 domének dimer vagy monomer szerkezete. Az utóbbi évek kutatásai derítettek fényt arra, hogy a bazális membrán mátrix metalloproteinázok által mediált degradációja során felszabaduló NC1 domének önálló bioaktív molekulaként képesek angiogenezist gátló hatást kifejteni egyes szövetekben,¹⁷⁹ azonban az arresztin ($\alpha 1$), kanstatin, ($\alpha 2$) tumstatin ($\alpha 3$) és $\alpha 6$ NC1 domének dimer vagy monomer voltának jelentőségét ezidáig nem vizsgálták ebben a jelenségben.

A kollagén IV NC1 domének közötti keresztkötés kialakulása minden valószínűség szerint a bazális membránban zajló folyamat, amely csak a PXDN extracelluláris térbe történő szekrécióját követően valósulhat meg. Munkacsoportunk

korábbi kísérleteiben a humán fehérje C-terminális szegmense ellen termeltetett, poliklonális antitesttel már detektált az extracelluláris térre lokalizált, fibrilláris megjelenésű PXDN festődést TGF β -val indukált humán pulmonális és dermális fibroblasztok mintáiban, aminek specificitását siRNS kezeléssel igazolta.⁸⁰ Ugyanezen antitest alkalmazásával végzett immunhisztokémiai vizsgálat során a fibrotikusan átalakuló egér veseszövetben is észleltek extracellulárisnak mutató jeleket,⁸⁰ azonban a kísérletek idején még nem állt rendelkezésükre megfelelő genetikai kontroll a kapott festődés validálására. Az azóta birtokunkba került PXDN knockout és vad típusú egerek a jövőben lehetőséget biztosítanak a PXDN emlős szövetekben mutatott elhelyezkedésének felderítésére és a korábban kapott eredmények validálására.

7.2. A PXDN oligomerizációjának mechanizmusa

A többnyire komplex harmadlagos szerkezettel jellemezhető ECM fehérjék esetében a változatos domének jelenléte a különböző proteinek közötti molekuláris kapcsolatokon túl sok esetben oligomerek kialakítására is lehetőséget nyújt. Az oligomerformálás számos funkcionális előnyt biztosíthat: az így kialakuló homokomplexek nagyobb stabilitást mutathatnak az egy láncból álló molekulánál, többszörös interakciók kialakítását teszik lehetővé és a fehérje egyes doménjeinek pozicionálásában is szerepet játszhatnak. Az oligomerizáció folyamatában többféle molekuláris részlet is részt vehet kovalens és másodrendű kémiai kötések kialakításával. A kollagén IV protomert alkotó heterotrimer létrejötte a globuláris NC1 domének asszociációjával indul meg, majd a kollagenózus domének hármas hélixének felcsavarodását követően a 7S domének összerendeződésével és többszörös diszulfidhidak kialakulásával válik teljessé.^{112,180} A bazális membránok másik domináns komponense, a laminin az α , β és γ láncok α -helikális régióin keresztül szerveződik jellegzetes hármas szerkezetbe.¹⁸¹ Az így nyert funkcionális egységek asszociációjával alakul ki a bazális membránban a két fehérje egymással is összeköttetésben álló hálózata.^{132,133} A PXDN az ECM fehérjékre jellemző szegmenseken túl egy peroxidáz domént is tartalmaz, amely az állati hem-peroxidáz család egyes tagjai, így az MPO és az LPO esetében a katalitikus aktivitáson túl a homodimerképzésért is felelős.^{38,64}

A *Drosophila* PXDN első leírását tartalmazó közlemény szerzői kimutatták, hogy a fehérje homotrimerként kerül az azt kifejező hemocitákból a sejten kívüli térbe,⁷⁶ azonban sem az oligomerformálásban érintett molekuláris részeket, sem a folyamat funkcionális következményeit nem elemezték a továbbiakban. Az endogén emlős PXDN szupramolekuláris szerkezetének vizsgálatát a korábbi kísérleteinkben felhasznált, humán eredetű HUVEC és egérből származó MEF sejtek nem redukált lizátumain kezdtük meg. Ezek Western blot analízise során 500 kDa-nál detektáltunk domináns, PXDN-specifikus szignált a 300 kDa és 160 kDa környékén kisebb intenzitással megjelenő jelek mellett. Ezt követően a rekombináns humán PXDN-t stabilan expresszáló HEK293FS sejtek nem redukáló lizátumából készült Western bloton is a V5-pozitív fehérjesávok azonos elrendeződését figyeltük meg. A PXDN-t tartalmazó fehérjekomplexeket immunprecipitációval izoláltuk a két sejtípus lizátumaiból, ezt követően pedig a HUVEC sejtől tisztított magas molekulatömegű fehérjekomplex, illetve a stabil HEK sejtekből nyert három fehérjesáv proteomikai analízisével határoztuk meg azok összetételét. A tömegspektrometriai vizsgálatot végző együttműködő partnereink a PXDN-t a minták egyedüli összetevőjeként azonosították mind a négy esetben. A fehérjekomplexek látszólagos molekulatömege és kizárólagos PXDN tartalma alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az 500 kDa-os fehérjekomplex az emlős PXDN által dominánsan képzett homotrimernek felel meg, amíg a 160 kDa-os és 300 kDa-os forma a túlexpresszált fehérje esetében nagyobb mennyiségben megjelenő kiindulási és köztes állapotot jelentheti az oligomerizációs folyamatban. A komplexek β -merkaptóetanollal szemben mutatott érzékenysége azt valószínűsítette, hogy a láncok összeépülése intermolekuláris diszulfidkötések kialakításával valósul meg.

A PXDN homotrimert stabilizáló diszulfidhidak helyzetének meghatározására első megközelítésben a dolgozatban nem tárgyalt tömegspektrometriai vizsgálattal tettünk kísérletet. Két különböző SH-reagens, az N-etilmaleimid (NEM), majd közbeiktatott redukciós lépést követően a jódiacetamid (IAA) szekvenciális alkalmazásával kapott ciszteinalkilációs kép alapján kívántuk meghatározni a fehérjeminta kiindulási állapotában szabad és diszulfidhidat képező ciszteinjeinek pozícióját. Emellett redukálószerrel nem kezelt mintákban is megkíséreltük a diszulfidkötésekkel összetartott triptikus és egyéb emésztőenzimokkal nyert peptidek azonosítását. A rekombináns fehérje trimerizációs folyamatának három állomását jelentő

mintákból nyert adatok eltérései alapján szeretnénk volna felderíteni az egyes állapotok közötti átmenetben újonnan képződő diszulfidhidak elhelyezkedését. Ezek meghatározása a gyakorlatban kiemelkedően nehéz analitikai feladatnak bizonyult, amivel csak korlátozott sikereket értünk el. Habár több, a hem-peroxidázok közötti szekvenciahomológia alapján előre feltételezett intramolekuláris diszulfidhidat is sikerült megbízhatóan kimutatnunk, a 46 ciszteint tartalmazó, igen nagyméretű PXDN fehérje esetében a proteázemésztéssel nyert fehérjedarabok méretéből adódó technikai problémák, a peptidek kinyerésének alacsony hatásfoka és az LC-MS/MS mérés során kapott komplex adathalmaz elemzésének nehézsége más megközelítést tett szükségessé a kérdés megválaszolására.

Az endogén és a rekombináns humán PXDN oligomerizációs mintázatának egyezése lehetőséget teremtett arra, hogy a trimerképzés mechanizmusát HEK293FS sejtekben kifejezett, módosított szerkezetű PXDN konstruktok segítségével vizsgáljuk. Doméneléziós mutánsainkkal az ECM motívumok potenciális szerepét kívántuk tisztázni a folyamatban, de a fehérjekomplex oxidatív érését lehetővé tevő, N-terminális szignál szekvencia megtartottsága mellett sem a ciszteinekben gazdag vWF C domén, sem az LRR és Ig C2 domének hiánya nem gátolta meg a magas molekulatömegű PXDN komplexek összeállását. Kísérleteinkben az oligomerizációt mutató legkisebb, a humán PXDN 696. és 1412. aminosava közé eső régióját tartalmazó konstrukt a peroxidáz doménnek és az azt követő α -helikális régióknak felelt meg. Mindkét doménről ismert, hogy képes egyes fehérjék oligomerizációját mediálni, ám amíg az α -helikális régió keresztüli asszociáció elsősorban másodrendű kémiai kötések kialakításával teszi lehetővé változatos sztöchiometriájú komplexek összerendeződését,¹⁸² addig a peroxidáz domén az MPO esetében diszulfid, az LPO-ban pedig ditirozin kovalens kötések keresztül kapcsolja össze a dimer formákat alkotó két fehérjealegységet.^{38,64} Bár előzetes eredményeink valószínűsítették, hogy a PXDN homotrimerben diszulfidkötések felelnek a komplex struktúrájának megerősítéséért, az LPO esetében igazolthoz hasonló, autokatalitikus oligomerizációs folyamat lehetőségét peroxidázaktivitás-hiányos mutáns PXDN konstrukt vizsgálatával zártuk ki.

Az állati hem-peroxidáz családba tartozó fehérjék szekvenciaillesztésével a humán PXDN vizsgált szakaszán négy olyan ciszteint azonosítottunk, melyek a peroxidáz domén kialakításában résztvevő cisztein reziduumoktól eltérő helyet foglalnak el a

fehérje primer szerkezetében. A 736., 1315., 1316. és 1319. pozíciójú ciszteinek trimerképzésben betöltött egyéni szerepét a vad típusú PXDN helyspecifikus mutagenézisével módosított formák oligomeralkotási képességének vizsgálatával határoztuk meg, aminek során a 736. és 1315. cisztein esszenciális szerepe igazolódott a folyamatban. A két domináns cisztein egyikének hiányában a dimer formájú PXDN magasságában figyeltünk meg megerősödő jeleket. Ennek magyarázatául szolgálhat a C-terminálisan érintetlenül maradó, 1316. vagy 1319. pozíciójú ciszteinek közreműködésével létrehozott új diszulfidhidak megjelenése a PXDN láncok között, melyek lehetővé teszik a fehérje erőltetett („forced”) dimerekbe rendeződését, azonban a teljes trimerizációs folyamat visszaállítására aspecifikus pozíciójuk miatt már nem alkalmasak. Amíg az 1316. cisztein szerinre cserélése nem befolyásolta a PXDN oligomeralkotási képességét, az 1315. vagy az 1319. cisztein mutációja esetében a dimerként és trimerként azonosított formáknál magasabb molekulatömeget mutató komplexek megjelenése új molekuláris partnerek, legvalószínűbben chaperonok kapcsolódására utalhat. Az 1319. cisztein megtartottsága ugyan nem bizonyult elengedhetetlennek a homotrimer-formálás során, azonban elképzelhető, hogy az redoxérzékeny aminosavként a környezet oxidatív státuszának közvetítésével képes befolyásolni a komplex megfelelő szerkezetének kialakulását, ennek vizsgálata azonban meghaladta a dolgozatban tárgyalt munka kereteit.

A fenti eredményeket ismertető közleményünk megjelenését követően nem sokkal egy, a rekombináns humán PXDN biokémiai analízisével foglalkozó független munkacsoport is megerősítette annak homotrimer szerkezetét, azonban az azt stabilizáló intermolekuláris diszulfidhidakat ők a vWF C doménon belüli, tovább nem pontosított pozíciójú ciszteinekhez kötötték.⁸² Az eredményeink közötti látszólagos ellentmondás magyarázatául szolgálhat a két tanulmányban vWF C doménhiányosként azonosított rekombináns PXDN formák C-terminálisan eltérő trunkálási pozíciója. Saját vizsgálatunk során a PXDN₁₋₁₄₁₂ konstrukt létrehozásához az UniProt alapján kijelölt 59 aminosavból álló domén kezdetétől induló C-terminális szakaszt hagytuk csak el a szekvenciából, az osztrák kutatócsoport azonban a peroxidáz domént közvetlenül követő, 1314. pozícióban végzett trunkálásával nem csak az oligomerizáció szempontjából vélhetően szintén jelentőséggel bíró α -helikális régiót, hanem a mutagenézis profilunk alapján esszenciálisnak bizonyult 1315. ciszteint is levágta a fehérjéről. A C-terminálisan

elhelyezkedő három cisztein rontásával létrehozott háromszoros PXDN mutánsunk, a C1315S, C1316S, C1319S vizsgálatainkban nem csak a fiziológias trimer, de erőltetett dimer forma kialakítására sem bizonyult alkalmasnak. Ez alapján érthető, hogy az említett ciszteinek mindegyikének elvesztésével járó, drasztikus csonkolás esetében teljesen eltűnő PXDN oligomerek alapján a szerzők téves következtetést vontak le az intermolekuláris diszulfidhidak fiziológias helyzetével kapcsolatban. A bécsi munkacsoport tömegspektrometriai analízis segítségével egy kivételével az összes prediktált intradomén diszulfidhidat ki tudta mutatni a vizsgált PXDN mintából, azonban az általunk részletesen vizsgált ciszteinek mindegyikét, köztük a 736. és 1315. pozíciójú is szabad formában detektálták. Ezt az eredményt elméletben magyarázhatná a negyedleges szerkezet kialakításáért felelős diszulfidok esetlegesen nagyobb sérülékenysége a fehérjeminta preparálása során. A 736. és 1315. ciszteinek igazolhatóan intramolekuláris kötésekben résztvevő társaiktól eltérő redox állapota mindenesetre inkább megerősíti feltételezésünket azoknak a komplex molekulászerkezet kialakításában betöltött központi szerepével kapcsolatban.

A humán, egér és *Drosophila* PXDN oligomerizációjával kapcsolatos egybeeső kísérletes adatok, illetve a kollagén IV NC1 keresztkötési reakció számos, egymástól igen távoli fejlődési szinten álló állatfajban igazolt megtartottsága⁹¹ felveti, hogy a folyamat a PXDN oldaláról is jól megőrzött szerkezeti jellemzőket igényelhet az állatvilág különböző szintjein. Az említett fajokon kívül *Xenopus tropicalis*ban és *Caenorhabditis elegans*ban írtak le a PXDN-nel összefüggésbe hozható fenotípusos eltéréseket,^{85,89,90} ezért azok PXDN szekvenciájának összehasonlításával vizsgáltuk, hogy a trimerizáció humán PXDN esetében igazolt strukturális feltételei vajon mindegyikben adódtak-e. A fehérjék aminosavsorrendjét jellemző nagyfokú hasonlóság az oligomerképzéshez esszenciális ciszteinekre is kiterjed, ami azt valószínűsíti, hogy a PXDN homotrimer kialakulása a vizsgált fajok között általános jelenség és azonos molekuláris mechanizmussal mehet végbe. Habár a PXDN nagyfokú evolúciós konzerváltsága⁸³ alapján joggal feltételezhető a humán fehérje esetében felderített trimerizációs mechanizmus univerzális jellege az élővilágban, a feltevés igazolása átfogó filogenetikai vizsgálatot és kísérletes megerősítést is igényelne.

Saját kísérleti eredményeink és a *Drosophila* PXDN forgó árnyékolással („rotary shadowing”) nyert elektronmikroszkópos képének szimmetrikus jellege⁷⁶ alapján

felállított szerkezeti modellünk szerint a PXDN homotrimer három alegysége virágcsokorszerűen rendeződik össze, melynek kialakításáért feltételezéseink szerint a fehérjeláncok α -helikális régiói lehetnek felelősek. A komplex szerkezetét ezt követően az egyik polipeptidláncban a 736. és a másikban a 1315. pozíciójú cisztein megfelelői között páronként kialakuló, ezáltal a három fehérjét körben összekapcsoló diszulfidhíd rendszer szilárdítja meg. A PXDN primer szekvenciájában egymástól távol eső kritikus ciszteinek az MPO^{38,48} és LPO kristályszerkezetéből^{40,62,63} kiindulva a peroxidáz domén harmadlagos szerkezetének kialakulását követően térben igen közel kerülnek egymáshoz, és az α -helikális régió keresztüli kapcsolódás is szerepet játszhat az intermolekuláris diszulfidhidakat adó ciszteinek pozicionálásában. A folyamat komplexitása alapján feltételezhető, hogy az oligomerizációban résztvevő doméneket érintő, azok szerkezetét jelentősen befolyásoló esetleges szekvenciabeli eltérések a trimerképzés folyamatát is megzavarhatják, aminek lehetséges funkcionális következményeit további kísérletekben igyekeztünk feltárni.

7.3. A PXDN ismert működéseinek szerkezeti feltételei

A PXDN egy, az ECM fehérjékre jellemző motívumainak köszönhetően adhezív tulajdonságokkal is bíró peroxidáz enzim, amely a sejten kívüli térbe szekretálódva látja el eddigi egyetlen ismert fiziológiás feladatát, a kollagén IV protomerek NC1 doménjeinek keresztükötését. Annak érdekében, hogy jobban megértsük a PXDN összetett szerkezete és működése közötti összefüggéseket, klasszikus struktúra-funkció analízist végeztünk, melynek keretében a rendelkezésünkre álló vad típusú és módosított szerkezetű rekombináns PXDN konstruktok viselkedését különböző tesztrendszerben hasonlítottuk össze.

A PXDN szekréciónál szükséges molekuláris részek felderítésének céljából a sejtenyésző médiumban vizsgáltuk a heterológ expressziós rendszerben kifejezett rekombináns fehérjék megjelenését, melyek minden egyéb szerkezeti jellemzőjüktől függetlenül detektálhatóak voltak a sejtek felülűszójában, ha N-terminális végükön megőriztük az eredeti PXDN szekvencia első 26 aminosavából álló peptidszakaszt. Predikációs szoftverek elemzése alapján ez a régió erős szekréciónál szignál szekvenciaként irányítja a PXDN-t az endoplazmás retikulumon és szekréciónál vezikulákon keresztül a

sejten kívüli kompartmentbe. A PXDN szekréciójának vizsgálatára választott kísérleti felállásban csak az apikális irányú fehérjetranszportot detektáltuk, de feltételezhetően a bazolaterális membránon keresztüli szekréciónak is szükséges és elégséges feltétele az N-terminális szignál peptid jelenléte. A PXDN apikális irányú szekréciójának lehetősége polarizált sejttípusokban *in vivo* körülmények között is lényeges kérdés lehet. Egy korábbi közleményében a PXDN-t vaszkuláris peroxidáz 1-ként (VPO1) azonosító munkacsoport feltehetően az érendotélből származó, enzimatikusan aktív PXDN monomereket mutatott ki humán, egér és borjú vérplazmában,⁸⁶ aminek később mind lehetséges antimikrobiális hatását, mind a plazmalipidek oxidatív módosításában játszott potenciális szerepét felvetette,¹⁰¹ laborunk azonban már a kiindulási megfigyelést sem tudta megerősíteni. A szekréció iránya befolyásolhatja az ECM fehérjéire gyakorta jellemző és működésüket alapvetően befolyásoló esetleges poszttranszlációs fehérjefeldolgozási lépések lehetőségét, hiszen az azokat kivitelező enzimek, többek között a limitált proteolízist végző proprotein konvertázok egy része eltérő megoszlást mutat a polarizált sejtek apikális és bazolaterális membránjában.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Habár munkacsoportunk érdeklődésének középpontjában elsősorban a PXDN kollagén IV-gyel és ezidáig ismeretlen fiziológiás szubsztrátjaival kialakított interakcióinak felderítése áll, a fehérje biokémiai jellegzetességeit tárgyaló közleményeknek köszönhetően számos, különböző kémiai tulajdonságokkal bíró molekula irányában mutatott *in vitro* peroxidázaktivitásáról rendelkezünk információval.^{44,76,81} Vizsgálatunkhoz mi a H₂O₂ és aktív peroxidáz jelenlétében fluoreszcens oxidációs terméké alakuló Amplex Red peroxidáz szubsztrátot választottuk. A folyamatban keletkező rezorufint érzékeny fluorimetriás méréssel detektáltuk, így tájékoztató képet kaptunk az egyes rekombináns konstrukciók katalitikus aktivitásáról. A PXDN aminosavsorrendjében a többi hem-peroxidáz hemkötéséért felelős konzervált reziduumok helyén található aminosavakat a PXDN szekvenciájába átültetve enzimaktivitás-hiányos mutánst nyertünk, ami indirekten igazolta a természetesen kialakult mutációk oki szerepét a PXDN peroxidázaktivitásának elvesztésében. A mérés során a trimer és monomer PXDN forma esetében kapott megegyező fluoreszcenciaértékek arra utaltak, hogy a komplex negyedleges szerkezet nem befolyásolta a fehérje peroxidáz doménjének hozzáférését a kisméretű mesterséges szubsztráthoz. Amíg a C-terminális vWF C domén hiánya nem módosította a PXDN *in*

in vitro enzimaktivitását, a peroxidáz doméntől N-terminálisan elhelyezkedő molekularészleteké megszüntette azt. Az utóbbi rekombináns konstrukt létrehozásához a PXDN korábban leírt rövid izoformájának tanulmányozása során nyert cDNS-t használtuk fel,⁷⁷ amelynek 5' vége egybeesik a peroxidáz domént kódoló DNS szekvencia kezdeti szakaszával. Feltételezéseink szerint a konstrukt hiányzó katalitikus aktivitásának hátterében az átíródó protein hibás feltekeredése állhat, ami az N-terminális irányban található linker régió jelentőségére utal a domén megfelelő szerkezetének kialakítása során. A rövid PXDN izoformát leíró közleményben a fehérje apoptózis során megnövekedő expressziójának a folyamatra szintén jellemző oxidatív stressz kialakításában tulajdonítottak szerepet,⁷⁷ ami a rekombináns fehérje hiányzó peroxidázaktivitását kimutató eredményeink fényében megkérdőjelezhetőnek tűnik. Ezt a konstruktot a harmadlagos szerkezet feltételezett anomáliája miatt több funkcionális assay-ben nem teszteltük, emiatt azonban a peroxidáz doméntől N-terminálisan elhelyezkedő molekulafél kollagén IV keresztkötést és lokalizációt befolyásoló szerepét nem tudtuk felderíteni. Mivel az itt található domének fontos szerepet játszhatnak a PXDN ezidáig ismeretlen molekulapartnereihez, azon belül is esetleges sejtfelszíni receptoraihoz történő kapcsolódásában, a továbbiakban megkerülhetetlen feladat lesz új, az LRR és Ig C2 domének külön-külön delécióját hordozó, illetve a peroxidáz domént megelőző linker régiót még tartalmazó N-terminálisan trunkált rekombináns PXDN forma klónozása és bemutatott tesztrendszerünkben történő szisztematikus vizsgálata.

Az ismert fiziológias működést modellező kollagén IV keresztkötési vizsgálatban PXDN-hiányos MEF sejteket használtunk fel, amelyek a génkiütés következtében hiányzó fehérje kivételével a kollagén IV hálózat szintéziséhez szükséges összes molekuláris résztvevővel rendelkeznek. A nehezen transzfektálható primer sejtekbe sikerült hatékonyan bejuttatnunk a rekombináns PXDN konstruktokat, majd az endogén PXDN vizsgálata során is alkalmazott protokoll szerinti hipotóniás lízist és kollagenáz enzimmel történő emésztést követően a kollagén IV NC1 doménjeit felismerő érzékeny antitesttel detektáltuk a keresztkötött dimerek megjelenését. Az enzimaktivitás-hiányos PXDN mutáns funkciómentő „rescue” kísérletekben tapasztalt hatástalansága az endogén fehérje esetében phloroglucinol peroxidáz-gátlószer alkalmazásával kapott eredmény új megerősítést is jelentette, mely szerint a kollagén IV keresztkötéshez az emlős PXDN enzimaktivitása elengedhetetlen tényező. Az N-terminálisan trunkált konstrukt az

Amplex Red peroxidáz mérésben kimutatott hiányzó enzimaktivitása miatt ebben a felállásban nem teszteltük, a vWF C doménhiányos fehérje azonban a vad típusú rekombináns formával azonos hatékonysággal állította vissza az NC1 domének vad típusú MEF sejtekben tapasztalt keresztköttési mintázatát. A monomer szerkezetű PXDN ugyan megtartotta kollagén IV keresztköttési képességét, a másik két hatékony konstrukthoz viszonyítva azonban konzisztensen kisebb mennyiségű NC1 dimer kialakulását katalizálta. Ennek hátterében a két konstruktt kétféle heterológ expressziós rendszerben is megerősített lokalizációbeli különbségének oki szerepét feltételeztük. A vad típusú fehérje a tranziensen transzfektált Cos7 és MEF sejtek esetében is kettős, az endoplazmás retikulum mellett membrán menti extracelluláris struktúrákra is kiterjedő elhelyezkedést mutatott, amíg a monomer forma esetében az utóbbi megjelenés nem volt megfigyelhető.

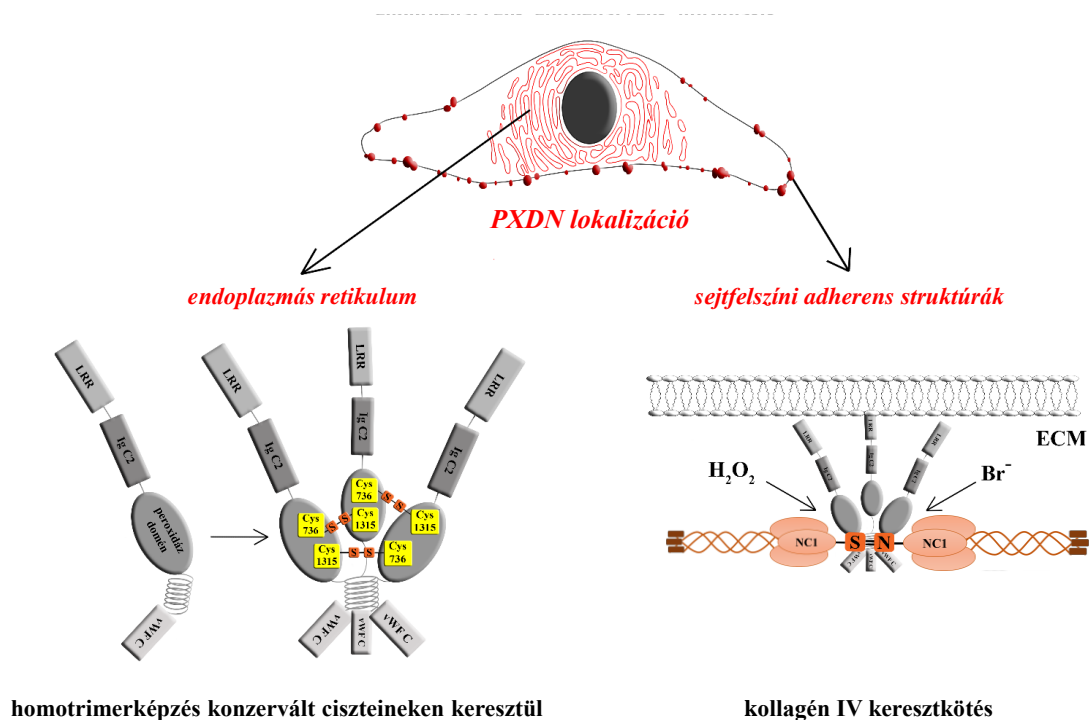
Amíg az oligomer forma kialakulása sem a fehérje szekréciónak, sem *in vitro* peroxidázaktivitását nem befolyásolta, az előzőeknél jóval összetettebb kollagén IV keresztköttési folyamat optimális hatékonyságához elengedhetetlennek bizonyult a PXDN trimerképzése, aminek részben magyarázatul szolgálhat a fehérje sejt felszíni asszociációjának az intakt negyedleges szerkezet megtartottságával mutatott összefüggése. A NC1 domének közötti szulfiliminkötések létrehozásához a PXDN homotrimer és a kollagén IV protomerek megfelelő pozicionálásán kívül Br^- és H_2O_2 jelenléte is szükséges. A keresztköttési reakció Br^- igényének mértékéről, illetve az ion sejten kívüli térben való megoszlásáról – részben a nyomelem biológiai jelentőségének nemrégiben történt felismerése okán – egyelőre kevés ismerettel rendelkezünk, bár a közelmúltban publikált adatok alapján az ion valószínűleg a szövetek nagy hányadában megjelenik.¹⁸⁶ Az ezidáig tisztázatlan forrásból származó H_2O_2 elérhetősége a katalitikus folyamat szempontjából meghatározó jelentőségű lehet. A H_2O_2 extracelluláris térben történő termelődéséért több különböző enzimfehérje, köztük egyes NADPH-oxidázok működése is felelőssé tehető, azonban a sejtek metabolizmusának melléktermékeként intracellulárisan keletkező ROS szabályozatlan kicsorgása is hozzájárul a sejten kívüli tér H_2O_2 tartalmához.^{7,28} A kollagén IV keresztköttésnek a bazális membrán stabilizálásán túl az ECM-ből kiinduló szignalizációs útvonalak modulálását is magában foglaló, összetett biológiai jelentősége alapján feltételezhető, hogy az térben és időben is precízen regulált folyamat, amelynek követelményeit egy szabályozott H_2O_2 forrás feltehetően jobban

kielégítené. Az állati hem-peroxidáz család egyéb tagjainak esetében szoros funkcionális együttműködés igazolható bizonyos NADPH-oxidázokkal, ami felveti az enzimes család képviselőinek potenciális szerepét a PXDN működéséhez szükséges oxigéntartalmú intermedierek előállításában. Habár a PXDN ubikviter szöveti megjelenése⁸⁰ egy szintén általános előfordulású ROS forrást feltételez, az egyes NADPH-oxidázok expressziós mintázatával kapcsolatban napi szinten változó ismereteink²⁹ alapján a PXDN-nel való funkcionális kapcsolatuk nem zárható ki pusztán elméleti alapon, így a kérdés genetikai kontrollokkal történő részletes vizsgálata munkacsoportunk további kísérleteinek fontos szegmensét jelenti.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a korábban nem ismert, sejtfelszínen megjelenő, PXDN-ben gazdag struktúrák a kollagén IV keresztkötés „forró pontjaiként” a folyamat fiziológiás helyét jelentik, melyek a H₂O₂ ezidáig ismeretlen, de minden bizonnyal sejtekhez köthető forrásához kapcsolhatják a reakció további résztvevőit. A rekombináns PXDN esetében pontszerűen festődő képletek emellett adhezív funkciót is betölthetnek, amire a peroxidázaktivitás-hiányos mutáns konstruktunk, valamint a PXDNL rekombináns formájának azonos elhelyezkedése is utalhat. A vad típusú rekombináns PXDN sejtfelszíni lokalizációjának igazolását két különböző antitesttel is elvégeztük, azonban mind a PXDN-specifikus poliklonális nyúl, mind a V5-öt felismerő monoklonális egér antitest a fehérjekonstrukt C-terminális szegmensét ismeri fel. Hogy az említett régió korlátozott hozzáférhetősége vagy esetleges processzálódása ne vezethessen minket hibás következtetésekre az egyes rekombináns konstruktok lokalizációjának értékelése során, a későbbiekben a PXDN más pozíciójában található epitóp kimutatásával is érdemes lehet megerősítenünk a kapott eredményeket.

Az endogén PXDN vizsgálatával, valamint a rekombináns forma struktúra-funkció analízisével nyert eredményeink alapján alkottuk meg a fehérje kollagén IV keresztkötési működéséről felállított modellünket, melyet a 38. ábra mutat be. A PXDN intakt negyedleges struktúrájának és fiziológiás működésének szoros kapcsoltsága felveti annak elméleti lehetőségét, hogy a fehérje oligomerizációját megzavaró szerkezeti módosulások annak definitív degradációja nélkül is könnyen vezethetnek a NC1 keresztkötési reakció deficitjéhez vagy más, a homotrimer PXDN ezidáig ismeretlen fehérjepartnereinek közreműködésével kialakuló funkcionális következményekhez. Munkánk, bár sok lényeges és ezidáig nem ismert részletet fedett fel a PXDN

működésével kapcsolatban, jelen tudásunk mellett sem tekinthető teljesnek. Feltételezhető, hogy az ECM más komponensei is módosulhatnak a PXDN katalitikus működése során, valamint az adhézión doménekkel kialakított molekuláris interakcióknak is fontos szerepük lehet a fehérje funkciójának szabályozásában, melyeket az ismertett technikai okokból egyelőre csak igen kis részben sikerült feltérképeznünk. Vizsgálatunk egyik igen érdekes eredménye volt, hogy a ciszteinekben gazdag vWF C domén egyetlen tesztelt funkciójában sem bírt érdemi jelentőséggel, ami arra utal, hogy ez a molekuláris eltérő folyamatok mediálásában vehet részt. Ezek felderítése a domén jellegéből adódó potenciális biológiai szerepek ismeretében érdekes kérdés. A PXDN ECM fehérjék többségére nem jellemző endoplazmás retikulumban megfigyelt dúsulása az erősen oxidatív közeget képviselő sejtorganelumra lokalizált enzimhatások lehetőségét is felveti, amelyek vizsgálatában a rekombináns PXDN ER-retenciós szignállal ellátott formájának létrehozása, majd annak segítségével rezidens molekulapartnerek azonosítása nyújthat segítséget.



38. ábra: A PXDN trimerizációjának és kollagén IV keresztkötési reakciójának modellje. A rekombináns konstruktok vizsgálata alapján felállított modellünk szerint a PXDN 736. és 1315. pozícióban található cisztein reziduumaik keresztül homotrimer formát alakít ki az endoplazmás retikulum lumenében, majd szekrécióját követően a kollagén IV keresztkötési reakció helyét biztosító sejtfelszíni adherens struktúrákba rendeződik.

7.4. A PXDNL szekvencia- és lokalizációvizsgálata

A PXDNL a PXDN szívspecifikusan expresszálódó homológja, amely a nagymértékben hasonló aminosavsorrenden túl azonos doménszerkezeten is osztozik az ubikviter előfordulású fehérjével. Munkacsoportunk már korábban kimutatta, hogy a humán PXDNL nem rendelkezik peroxidázaktivitással, aminek okaként a hem-peroxidáz enzimsaládban konzervált, a hem kötéséhez szükséges aminosavakat érintő szekvenciabeli eltéréseket valószínűsítettük.¹⁰² A PXDN struktúra-funkció vizsgálata során az említett aminosavakat a PXDNL homológ pozícióiban találhatóakra cserélve hoztuk létre a Q823W, D826E konstruktot, amelynek hiányzó peroxidázaktivitása megerősítette a bevitt mutációk jelentőségét a PXDNL funkcióvesztésének háttérében. A PXDNL élővilágban mutatott elterjedése különösen érdekes mintázatot mutat, hiszen több alacsonyabbrendű élőlényben is azonosítható a PXDNL-nek megfeleltethető PXDN-homológ fehérje, azonban az több esetben sem tartalmazza az említett, enzimműködést befolyásoló aminosavcseréket, a rágcsálók genomjából pedig hiányzik a *pxdnl* gén. Ezek a megfigyelések a gén folyamatban lévő elcsendesedésére utalhatnak a fajfejlődés során, de ennek a feltevésnek az igazolása részletes molekulaevolúciós analízist igényelne. A humán PXDNL esetében mindenesetre sikerült bizonyítanunk az enzimaktivitás elvesztését az adhezív molekularészletek megtartottsága mellett.

A PXDNL jellegzetes szívspecifikus expresszója, illetve fajok közötti korlátozott megjelenése a megfelelő kontrollok hiánya miatt az endogén fehérje vizsgálatának komoly korlátját jelenti. A PXDNL szöveten belüli elhelyezkedését kollégáim szívizommetszeten végzett immunhisztokémiai vizsgálattal próbálták feltérképezni,¹⁰² azonban humán eredetű minta lévén nem állt rendelkezésünkre genetikai kontroll a festés validálására. Több, szívizomsejt jellegzetességekkel is bíró sejtvonal (HL1, H9C2, AC16) is felmerülhet a sejtszintű PXDNL lokalizáció detektálásának eszközeként. Az említett sejtvonalak azonban igen jelentős fenotípusos eltéréseket hordoznak a differenciált szívizomsejtekkel történő összehasonlításban, melyek izolálása és sejtkultúra-körülmények közötti fenntartása technikai nehézségeket okozhat. Munkacsoportunk egyes kísérleteihez indukált pluripotens őssejt (iPS) eredetű kardiomiocitákat is felhasznált, amelyekben ugyan lehetőség nyílik a fehérjeexpresszió szintek, így akár a PXDNL kifejeződésének RNS interferenciával történő csökkentésére

és ezáltal a fehérje festődési képének kontrollálására, a megfelelő reagensek hiányában azonban ilyen kísérleteket nem állt módunkban elvégezni.

Munkacsoportunk saját készítésű, PXDNL-specifikus antitestjével humán szívizommetszeteken az interkaláris korongoknak (Eberth-vonalak), valamint a kardiomiociták oldalsó membránjának megfelelően kapott jelölődést, az iPS-eredetű kardiomiocitákban pedig az endoplazmás retikulumban és a sejtmembrán mentén észleltünk erős festődést.¹⁰² Annak megerősítésére, hogy az endogén fehérje esetében a membrán mellett megfigyelt szignálok valóban a szekréciót követően az extracelluláris térbe került PXDNL-hez köthetők, a heterológ expressziós rendszerben kifejezett rekombináns, V5-tag-gel ellátott fehérje elhelyezkedését vizsgáltuk a transzfektált Cos7 sejtek megelőző permeabilizálásával vagy anélkül végzett immunfestés segítségével. A V5-specifikus antitesttel a rekombináns PXDN esetében látotthoz igen hasonló, kettős jelölődést tapasztaltunk, melynek endoplazmás retikulumhoz lokalizált komponense csak a membránszerkezet detergenssel történt megbontását követően vált hozzáférhetővé az antitestek számára. A sejtek membránja mentén megjelenő, pontszerűen festődő struktúrák a megelőző permeabilizálástól függetlenül is detektálhatóak voltak a PXDNL-t kifejező sejtekben, ami azok extracelluláris elhelyezkedését támasztotta alá.

A PXDNL részletes szerkezet-funkció vizsgálata helyett igyekeztünk felderíteni azokat a PXDN-nel mutatott szekvenciabeli hasonlóságokat, amelyek magyarázatául szolgálhatnak a rekombináns konstrukttal kapott eredményeinknek. A PXDNL N-terminális 23 aminosavból álló szakaszát több predikciós szoftver is szekréciós szignál szekvenciaként azonosította, amelynek PXDN-ben található megfelelőjéről bebizonyítottuk, hogy igen hatékonyan irányítja az extracelluláris tér irányába a fehérjét. Kollégám, Dr. Péterfi Zalán doktori értekezésében bemutatta, hogy a PXDNL nem redukáló körülmények között magas molekulatömegű komplexek részét képezi, melyek összetételét azonban nem elemezte részletesen a későbbiekben. Mivel a komplexekből származó, PXDNL-specifikus jelek a PXDN oligomerek molekulatömegének megfelelő magasságokban jelentek meg a Western blot analízis során, azt feltételeztük, hogy azok ebben az esetben is egy trimerizációs folyamat különböző állomásainak felelhetnek meg. A PXDN homotrimer stabilizálásában kulcsszerepet játszó, konzervált ciszteinek a PXDNL homológ, 722. és 1298. pozícióiban is megőrzöttek, és a környező aminosavrégiók is nagymértékben hasonlóak a két fehérje között. Ez azt támogatja, hogy

a PXDNL a PXDN-hez hasonlóan homotrimer alakít ki, melynek létrejöttében az említett ciszteinek közötti diszulfidhidak játszhatnak központi szerepet. Mivel a PXDN esetében az extracelluláris, pontszerű festődés megjelenése a fehérje trimerképzésétől függött, a PXDNL vizsgálata során látott igen hasonló festődési kép is megerősítheti a fehérje homotrimer formájával kapcsolatos feltevésünket.

A PXDN és PXDNL szerkezete és sejtszintű lokalizációja között tapasztalt nagymértékű hasonlóság különösen érdekes a kollégám doktori értekezésében tárgyalt korábbi eredmények fényében, melyek szerint a rekombináns PXDNL a PXDN-nel komplexet alkotva képes antagonizálni annak peroxidázaktivitását. Az ehhez szükséges molekuláris interakció létrejöttének logikus módja lehetne a két fehérje részvételével történő heterotrimer-képzés az endoplazmás retikulumban zajló oligomerizáció során. Megfelelő vizsgálati rendszer hiányában egyelőre nem tudtuk azt megfigyelni, hogy a rekombináns fehérjék esetében látott összefüggések az endogén PXDN és PXDNL esetében is fennállnak-e, melyek a PXDN funkció szabályozásának egy igen különleges és egyben szívspecifikus megjelenési formáját jelenhetnék. A PXDN és PXDNL potenciális antagonizmusa nem csak a szív ECM-jében zajló kollagén IV keresztkötési reakciót, hanem más, ezidáig ismeretlen PXDN szubsztrátok módosítását is befolyásolhatná. Az is elképzelhető, hogy a kiemelten nagy energia- és oxigénigénnyel jellemezhető szívizom esetében a két fehérje arányának változása a szövet oxidatív státuszát befolyásolhatná, ami azért is különösen izgalmas lehetőség, mert csoportunk korábbi munkájában a PXDNL mRNS megnövekedett szintjét mutatta ki az ismertén eltolódott ROS egyensúllyal jellemezhető dilatatív kardiomiopátiában (DCM) szenvedő betegek szívizommintáiban.¹⁰² Ezek a spekulatív feltételezések nem zárják ki, hogy a PXDNL az említettektől teljesen eltérő, elsősorban adhézión jellemzőin alapuló funkciót tölt be a szívben, de a fehérje mRNS-ének pitvarokban és az ingervezető rendszer egyes részein mutatott magas expressziója¹⁰² az ingerületterjedésben betöltött szerepet is valószínűsíthet. A rekombináns fehérje elhelyezkedése és a PXDN és PXDNL közötti szekvenciahomológia elemzése alapján azt valószínűsítjük, hogy a PXDNL fehérje szintézisét követően a kardiomiocitákból szekréción kerül, és az azokat beburkoló bazális membránban trimer formában látja el ezidáig ismeretlen funkcióját. Megfelelő vizsgálati rendszerek fejlesztését követően a szívizomban endogénen kifejeződő fehérje analízise teszi majd lehetővé ezeknek a felvetéseknek az igazolását vagy cáfolatát.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

Az emlős PXDN és PXDNL vizsgálata során nyert kísérleti eredményeinkből az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Az endogén PXDN enzimaktivitása primer emlős sejtekben is esszenciális a bazális membránokat alkotó kollagén IV protomerek NC1 doménjeinek szulfilimin csoporton keresztüli összekapcsolásához.
2. A PXDN saját peroxidázaktivitásától független mechanizmussal domináns megjelenési formáját jelentő homotrimerbe rendeződik. Ennek szerkezetét intermolekuláris diszulfidhidak stabilizálják, melyek a peroxidáz doménben és annak közvetlen szomszédságában található, a humán szekvenciában 736. és 1315. pozíciót elfoglaló, evolúciósan erősen konzervált cisztein reziduumok között jönnek létre.
3. A PXDN szekréciójának az azt irányító szignál szekvencia, *in vitro* peroxidázaktivitásának pedig a hemet kötő katalitikus domén intakt harmadlagos szerkezetének megtartottsága a szükséges és egyben elégséges szerkezeti követelménye. A von Willebrand faktor C-típusú domén az eddig megismert PXDN-hez köthető működések egyikében sem bír funkcionális jelentőséggel. A homotrimer forma kialakulása a PXDN endoplazmás retikulum lokalizációjának nem, a fehérje sejt felszíni megjelenésének és az optimális hatékonyságú kollagén IV keresztkötési lépésnek azonban egyaránt előfeltétele. Ezek alapján a kollagén IV NC1 domének és a PXDN között lejátszódó enzimreakció fiziológias helyét a sejtmembránhoz asszociált, PXDN-t tartalmazó "hot spot"-ok jelenthetik, melyek emellett a PXDN katalitikus aktivitásától független, adhezív szerepet is betölthetnek.
4. A két fehérje homológiája és a résztvevő ciszteinek konzerváltsága alapján valószínűsíthető, hogy a PXDNL a PXDN-nel azonos módon alkot homotrimer szerkezetet. A rekombináns PXDNL heterológ expressziós rendszerben a PXDN-hez hasonlóan kettős lokalizációt mutat és az endoplazmás retikulumból az extracelluláris térbe szekretálódva kapcsolódik a sejtmembrán külső oldalához, ahol peroxidázaktivitás hiányában ezidáig ismeretlen, vélhetően adhezív funkciót lát el.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az extracelluláris mátrix (ECM) a szöveti homeosztázis fenntartásának fontos tényezője. Az ECM fiziológias működésében és egyes kórállapotokra jellemző károsodásának kialakulásában egyaránt fontos szerep jut a reaktív oxigénszármazékok (ROS) sok esetben peroxidáz enzimek által közvetített hatásainak. Az állati hemperoxidázok legújabban megismert képviselőjének, a peroxidazinnak (PXDN) széleskörű szöveti expressziója és a mátrixproteinek és peroxidáz enzimek strukturális jegyeit kombináló, különleges doménszerkezete előrevetítette a fehérje nemrégiben igazolt professzionális ECM-módosító szerepét. A PXDN az ECM specializált formáját jelentő bazális membránokban H_2O_2 és Br^- felhasználásával kovalens szulfiliminkötést létesít két kollagén IV protomer szemben fekvő NC1 doménjei között, ezáltal stabilizálva a mátrix domináns fehérjehálózatának szerkezetét. Doktori munkám során többféle megközelítéssel is alátámasztottuk, hogy a korábban csak alacsonyabbrendű élőlényekben vizsgált, PXDN által katalizált reakció emlősökben is a kollagén IV keresztkötés fiziológias útvonalát jelenti. Kimutattuk, hogy az emlős PXDN konzervált pozíciójú ciszteinek között kialakított intermolekuláris diszulfidhidak közreműködésével homotrimer formába rendeződik, ami a fehérje domináns megjelenési formáját jelenti. Rekombináns konstrukciókkal végzett struktúra-funkció vizsgálatunk segítségével azonosítottuk a PXDN szekréciónak, peroxidázaktivitásának és kollagén IV keresztkötési képességének szerkezeti követelményeit, valamint a fehérje korábban megfigyelt endoplazmás retikulum (ER) lokalizációján túl ezidáig ismeretlen, PXDN-ben dús képleteket mutattunk ki a sejtmembrán külső oldalán. A fehérje homotrimer formájának megtartottsága az optimális kollagén IV keresztkötési reakcióhoz és a sejtfelszíni asszociációhoz is elengedhetetlennek bizonyult, ami alapján azt feltételezzük, hogy az extracelluláris PXDN tartalmú struktúrák potenciális adhezív funkciójuk mellett az NC1 domének összekapcsolásának fiziológias helyét is jelenthetik. A PXDN szívspecifikusan kifejeződő funkcióvesztéses homológjában, a peroxidazin-szerű fehérjében (PXDNL) szekvenenciaanalízissel igazoltuk a trimerizáció strukturális feltételeinek megtartottságát, a rekombináns fehérje immunfestésével pedig annak PXDN-hez hasonlóan kettős, az ER mellett az ECM-re is kiterjedő elhelyezkedését.

10. SUMMARY

Extracellular matrix (ECM) plays a key role in the maintenance of tissue homeostasis. Both in its physiological function and in pathological alterations affecting the ECM, reactive oxygen species (ROS) are central mediators whose effects are often exerted by peroxidase enzymes. A novel member of the animal hem-peroxidase family, peroxidasin (PXDN) is characterized by widespread tissue expression and a unique domain structure combining features of matrix proteins and peroxidase enzymes which suggested its recently confirmed role as a professional ECM-modifying enzyme. In basal membranes, which constitute a specialized form of ECM, PXDN creates sulfilimine bonds between the NC1 domains of two adjacent collagen IV protomers using H₂O₂ and Br⁻ for the process, thus stabilizing the structure of the dominant protein network in the matrix. As the PXDN-catalyzed reaction has only been studied in lower species so far, in my PhD project we applied different approaches to confirm that collagen IV crosslinking is also a physiological function of mammalian PXDN. We demonstrated that PXDN assembles into its dominant homotrimeric complex through the formation of intermolecular disulphide bonds between conserved cysteine residues. In a structure-function analysis performed with various recombinant PXDN constructs we determined the structural requirements for secretion, peroxidase activity and collagen IV crosslinking activity of the protein. Besides its well-studied endoplasmic reticulum (ER) localization we also identified previously unknown PXDN-rich structures on the outer surface of the plasma membrane. Since homotrimer formation of PXDN appeared to be necessary for both optimal collagen IV crosslinking and association to the cell surface, we assume that, in addition to their possible adhesive role, these PXDN-rich extracellular “hot spots” might constitute the physiological sites of action for NC1 binding. Investigating peroxidasin-like protein (PXDNL), the heart-specific loss-of-function homologue of PXDN, we found the structural prerequisites for trimerization preserved in its sequence and with immunostaining of the recombinant protein we revealed its dual, ER-ECM localization pattern similar to PXDN.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Pryor, W.A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* **48**, 657-667.
2. Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. & Darley-Usmar, V.M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 385-400.
3. Lemire, J.A., Harrison, J.J. & Turner, R.J. (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* **11**, 371-384.
4. Morrison, M. & Schonbaum, G.R. (1976) Peroxidase-catalyzed halogenation. *Annu Rev Biochem* **45**, 861-888.
5. Kanofsky, J.R. & Sima, P. (1991) Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem* **266**, 9039-9042.
6. Halliwell, B. (2011) Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* **32**, 125-130.
7. Bienert, G.P., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 994-1003.
8. Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**, 147-159.
9. Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**, 181-189.
10. Circu, M.L. & Aw, T.Y. (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* **48**, 749-762.
11. Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**, 1-13.
12. Holmstrom, K.M. & Finkel, T. (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 411-421.
13. Zito, E. (2015) ERO1: A protein disulfide oxidase and H₂O₂ producer. *Free Radic Biol Med* **83**, 299-304.
14. Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R. & Kang, S.W. (2003) Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* **14**, S211-215.

15. Enyedi, B., Varnai, P. & Geiszt, M. (2010) Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid Redox Signal* **13**, 721-729.
16. Barker, H.E., Cox, T.R. & Erler, J.T. (2012) The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 540-552.
17. del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A. & Maellaro, E. (1999) Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* **13**, 69-79.
18. Fukui, T. & Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* **15**, 1583-1606.
19. Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A. & Ho, D.S. (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* **279**, 32804-32812.
20. Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M. & Kirkman, H.N. (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* **73**, 334-339.
21. Battistuzzi, G., Bellei, M., Bortolotti, C.A. & Sola, M. (2010) Redox properties of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys* **500**, 21-36.
22. Davies, M.J., Hawkins, C.L., Pattison, D.I. & Rees, M.D. (2008) Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* **10**, 1199-1234.
23. Rhee, S.G., Woo, H.A., Kil, I.S. & Bae, S.H. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* **287**, 4403-4410.
24. Reddi, A.R. & Culotta, V.C. (2013) SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* **152**, 224-235.
25. Lu, J.M., Lin, P.H., Yao, Q. & Chen, C. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* **14**, 840-860.
26. Geiszt, M. & Leto, T.L. (2004) The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* **279**, 51715-51718.

27. Donko, A., Ruisanchez, E., Orient, A., Enyedi, B., Kapui, R., Peterfi, Z., de Deken, X., Benyo, Z. & Geiszt, M. (2010) Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic Biol Med* **49**, 2040-2048.
28. Geiszt, M. (2006) NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* **71**, 289-299.
29. Sirokmany, G., Donko, A. & Geiszt, M. (2016) Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends Pharmacol Sci* **37**, 318-327.
30. O'Brien, P.J. (2000) Peroxidases. *Chem Biol Interact* **129**, 113-139.
31. Forstrom, J.W., Zakowski, J.J. & Tappel, A.L. (1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-2644.
32. Kang, S.W., Baines, I.C. & Rhee, S.G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* **273**, 6303-6311.
33. Passardi, F., Bakalovic, N., Teixeira, F.K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C. & Dunand, C. (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics* **89**, 567-579.
34. Zamocky, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Souidi, M., Pirker, K.F., Furtmuller, P.G. & Obinger, C. (2015) Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Arch Biochem Biophys* **574**, 108-119.
35. Loughran, N.B., O'Connor, B., O'Fagain, C. & O'Connell, M.J. (2008) The phylogeny of the mammalian heme peroxidases and the evolution of their diverse functions. *BMC Evol Biol* **8**, 101.
36. Rouzer, C.A. & Marnett, L.J. (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S29-34.
37. Zederbauer, M., Furtmuller, P.G., Ganster, B., Moguelevsky, N. & Obinger, C. (2007) The vinyl-sulfonium bond in human myeloperoxidase: impact on compound I formation and reduction by halides and thiocyanate. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 450-456.
38. Fiedler, T.J., Davey, C.A. & Fenna, R.E. (2000) X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. *J Biol Chem* **275**, 11964-11971.

39. Carpena, X., Vidossich, P., Schroettner, K., Calisto, B.M., Banerjee, S., Stampler, J., Soudi, M., Furtmuller, P.G., Rovira, C., Fita, I. & Obinger, C. (2009) Essential role of proximal histidine-asparagine interaction in mammalian peroxidases. *J Biol Chem* **284**, 25929-25937.
40. Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Singh, S.B., Kaur, P., Bhushan, A., Srinivasan, A. & Singh, T.P. (2008) Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **376**, 1060-1075.
41. Battistuzzi, G., Bellei, M., Zederbauer, M., Furtmuller, P.G., Sola, M. & Obinger, C. (2006) Redox thermodynamics of the Fe(III)/Fe(II) couple of human myeloperoxidase in its high-spin and low-spin forms. *Biochemistry* **45**, 12750-12755.
42. Brix, K., Fuhrer, D. & Biebermann, H. (2011) Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Res* **4 Suppl 1**, S9.
43. Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B. & Lipsky, P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* **12**, 1063-1073.
44. Bhave, G., Cummings, C.F., Vanacore, R.M., Kumagai-Cresse, C., Ero-Tolliver, I.A., Rafi, M., Kang, J.S., Pedchenko, V., Fessler, L.I., Fessler, J.H. & Hudson, B.G. (2012) Peroxidase forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. *Nat Chem Biol* **8**, 784-790.
45. Hansson, M., Olsson, I. & Nauseef, W.M. (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* **445**, 214-224.
46. van der Veen, B.S., de Winther, M.P. & Heeringa, P. (2009) Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2899-2937.
47. Davies, M.J. (2011) Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr* **48**, 8-19.
48. Zeng, J. & Fenna, R.E. (1992) X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J Mol Biol* **226**, 185-207.

49. Andersson, E., Hellman, L., Gullberg, U. & Olsson, I. (1998) The role of the propeptide for processing and sorting of human myeloperoxidase. *J Biol Chem* **273**, 4747-4753.
50. Banerjee, S., Stampler, J., Furtmuller, P.G. & Obinger, C. (2011) Conformational and thermal stability of mature dimeric human myeloperoxidase and a recombinant monomeric form from CHO cells. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 375-387.
51. Laura, R.P., Dong, D., Reynolds, W.F. & Maki, R.A. (2016) T47D Cells Expressing Myeloperoxidase Are Able to Process, Traffic and Store the Mature Protein in Lysosomes: Studies in T47D Cells Reveal a Role for Cys319 in MPO Biosynthesis that Precedes Its Known Role in Inter-Molecular Disulfide Bond Formation. *PLoS One* **11**, e0149391.
52. Lehrer, R.I. & Cline, M.J. (1969) Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* **48**, 1478-1488.
53. Anatoliotakis, N., Deftereos, S., Bouras, G., Giannopoulos, G., Tsounis, D., Angelidis, C., Kaoukis, A. & Stefanadis, C. (2013) Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* **13**, 115-138.
54. Nicholls, S.J. & Hazen, S.L. (2005) Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1102-1111.
55. Khoo, S.G., Al-Alawi, M., Walsh, M.T., Hannigan, K., Glynn, S., Thornton, M., McQuaid, S., Wang, Y., Hamilton, P.W., Verriere, V., Gleich, G.J., Harvey, B.J., Costello, R.W. & McGarvey, L.P. (2012) Eosinophil peroxidase induces the expression and function of acid-sensing ion channel-3 in allergic rhinitis: in vitro evidence in cultured epithelial cells. *Clin Exp Allergy* **42**, 1028-1039.
56. Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Petschallies, J., Eklund, E., Peterson, C.G., Fabel, H. & Krug, N. (2003) Local release of eosinophil peroxidase following segmental allergen provocation in asthma. *Clin Exp Allergy* **33**, 331-336.
57. Sharma, S., Singh, A.K., Kaushik, S., Sinha, M., Singh, R.P., Sharma, P., Sirohi, H., Kaur, P. & Singh, T.P. (2013) Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *Int J Biochem Mol Biol* **4**, 108-128.

58. Jong, E.C., Henderson, W.R. & Klebanoff, S.J. (1980) Bactericidal activity of eosinophil peroxidase. *J Immunol* **124**, 1378-1382.
59. van Dalen, C.J. & Kettle, A.J. (2001) Substrates and products of eosinophil peroxidase. *Biochem J* **358**, 233-239.
60. Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J.W., Lauredo, I., Forteza, R., Wanner, A., Salathe, M., Abraham, W.M. & Conner, G.E. (2000) The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**, 665-671.
61. Thomas, E.L., Jefferson, M.M., Joyner, R.E., Cook, G.S. & King, C.C. (1994) Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. *J Dent Res* **73**, 544-555.
62. Singh, A.K., Pandey, N., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S. & Singh, T.P. (2011) Structural evidence for the order of preference of inorganic substrates in mammalian heme peroxidases: crystal structure of the complex of lactoperoxidase with four inorganic substrates, SCN, I, Br and Cl. *Int J Biochem Mol Biol* **2**, 328-339.
63. Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Shin, K., Takase, M., Kaur, P., Srinivasan, A. & Singh, T.P. (2009) Inhibition of lactoperoxidase by its own catalytic product: crystal structure of the hypothiocyanate-inhibited bovine lactoperoxidase at 2.3-Å resolution. *Biophys J* **96**, 646-654.
64. Lardinois, O.M., Medzihradzsky, K.F. & Ortiz de Montellano, P.R. (1999) Spin trapping and protein cross-linking of the lactoperoxidase protein radical. *J Biol Chem* **274**, 35441-35448.
65. Al-Shehri, S.S., Knox, C.L., Liley, H.G., Cowley, D.M., Wright, J.R., Henman, M.G., Hewavitharana, A.K., Charles, B.G., Shaw, P.N., Sweeney, E.L. & Duley, J.A. (2015) Breastmilk-Saliva Interactions Boost Innate Immunity by Regulating the Oral Microbiome in Early Infancy. *PLoS One* **10**, e0135047.
66. Chandler, J.D. & Day, B.J. (2012) Thiocyanate: a potentially useful therapeutic agent with host defense and antioxidant properties. *Biochem Pharmacol* **84**, 1381-1387.
67. Morgan, P.E., Pattison, D.I., Talib, J., Summers, F.A., Harmer, J.A., Celermajer, D.S., Hawkins, C.L. & Davies, M.J. (2011) High plasma thiocyanate levels in

- smokers are a key determinant of thiol oxidation induced by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med* **51**, 1815-1822.
68. Ruf, J. & Carayon, P. (2006) Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **445**, 269-277.
 69. Nakamura, M., Yamazaki, I., Nakagawa, H., Ohtaki, S. & Ui, N. (1984) Iodination and oxidation of thyroglobulin catalyzed by thyroid peroxidase. *J Biol Chem* **259**, 359-364.
 70. Medeiros-Neto, G.A., Knobel, M., Yamamoto, K., Cavaliere, H. & Kallas, W. (1979) Deficient thyroid peroxidase causing organification defect and goitrous hypothyroidism. *J Endocrinol Invest* **2**, 353-357.
 71. Pommier, J., Tourniaire, J., Rahmoun, B., Deme, D., Pallo, D., Bornet, H. & Nunez, J. (1976) Thyroid iodine organification defects: a case with lack of thyroglobulin iodination and a case without any peroxidase activity. *J Clin Endocrinol Metab* **42**, 319-329.
 72. Lukinac, L., Kusic, Z., Nothig-Hus, D. & Kes, P. (1994) Thyroid peroxidase prevails over thyroid microsomal and thyroglobulin antibodies in thyroidal and nonthyroidal illnesses. *Acta Med Croatica* **48**, 63-66.
 73. Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. & Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926-13931.
 74. Picot, D., Loll, P.J. & Garavito, R.M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**, 243-249.
 75. Smith, W.L., DeWitt, D.L. & Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-182.
 76. Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G. & Fessler, J.H. (1994) Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J* **13**, 3438-3447.
 77. Horikoshi, N., Cong, J., Kley, N. & Shenk, T. (1999) Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the *Drosophila* peroxidasin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 864-869.

78. Mitchell, M.S., Kan-Mitchell, J., Mineev, B., Edman, C. & Deans, R.J. (2000) A novel melanoma gene (MG50) encoding the interleukin 1 receptor antagonist and six epitopes recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **60**, 6448-6456.
79. Weiler, S.R., Taylor, S.M., Deans, R.J., Kan-Mitchell, J., Mitchell, M.S. & Trent, J.M. (1994) Assignment of a human melanoma associated gene MG50 (D2S448) to chromosome 2p25.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **22**, 243-244.
80. Peterfi, Z., Donko, A., Orient, A., Sum, A., Prokai, A., Molnar, B., Vereb, Z., Rajnavolgyi, E., Kovacs, K.J., Muller, V., Szabo, A.J. & Geiszt, M. (2009) Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *Am J Pathol* **175**, 725-735.
81. Cheng, G., Salerno, J.C., Cao, Z., Pagano, P.J. & Lambeth, J.D. (2008) Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic Biol Med* **45**, 1682-1694.
82. Soudi, M., Paumann-Page, M., Delporte, C., Pirker, K.F., Bellei, M., Edenhofer, E., Stadlmayr, G., Battistuzzi, G., Boudjeltia, K.Z., Furtmuller, P.G., Van Antwerpen, P. & Obinger, C. (2015) Multidomain human peroxidasin 1 is a highly glycosylated and stable homotrimeric high spin ferric peroxidase. *J Biol Chem* **290**, 10876-10890.
83. Soudi, M., Zamocky, M., Jakopitsch, C., Furtmuller, P.G. & Obinger, C. (2012) Molecular evolution, structure, and function of peroxidasins. *Chem Biodivers* **9**, 1776-1793.
84. Harraz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schoneich, C. & Engelhardt, J.F. (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* **118**, 659-670.
85. Gotenstein, J.R., Swale, R.E., Fukuda, T., Wu, Z., Giurumescu, C.A., Goncharov, A., Jin, Y. & Chisholm, A.D. (2010) The *C. elegans* peroxidasin PXN-2 is essential for embryonic morphogenesis and inhibits adult axon regeneration. *Development* **137**, 3603-3613.

86. Cheng, G., Li, H., Cao, Z., Qiu, X., McCormick, S., Thannickal, V.J. & Nauseef, W.M. (2011) Vascular peroxidase-1 is rapidly secreted, circulates in plasma, and supports dityrosine cross-linking reactions. *Free Radic Biol Med* **51**, 1445-1453.
87. McCall, A.S., Cummings, C.F., Bhave, G., Vanacore, R., Page-McCaw, A. & Hudson, B.G. (2014) Bromine is an essential trace element for assembly of collagen IV scaffolds in tissue development and architecture. *Cell* **157**, 1380-1392.
88. Olofsson, B. & Page, D.T. (2005) Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**, 233-243.
89. Lee, J., Bandyopadhyay, J., Lee, J.I., Cho, I., Park, D. & Cho, J.H. (2015) A role for peroxidase PXN-1 in aspects of *C. elegans* development. *Mol Cells* **38**, 51-57.
90. Tindall, A.J., Pownall, M.E., Morris, I.D. & Isaacs, H.V. (2005) *Xenopus tropicalis* peroxidase gene is expressed within the developing neural tube and pronephric kidney. *Dev Dyn* **232**, 377-384.
91. Fidler, A.L., Vanacore, R.M., Chetyrkin, S.V., Pedchenko, V.K., Bhave, G., Yin, V.P., Stothers, C.L., Rose, K.L., McDonald, W.H., Clark, T.A., Borza, D.B., Steele, R.E., Ivy, M.T., Aspirnauts, Hudson, J.K. & Hudson, B.G. (2014) A unique covalent bond in basement membrane is a primordial innovation for tissue evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 331-336.
92. Choi, A., Lao, R., Ling-Fung Tang, P., Wan, E., Mayer, W., Bardakjian, T., Shaw, G.M., Kwok, P.Y., Schneider, A. & Slavotinek, A. (2015) Novel mutations in PXDN cause microphthalmia and anterior segment dysgenesis. *Eur J Hum Genet* **23**, 337-341.
93. Khan, K., Rudkin, A., Parry, D.A., Burdon, K.P., McKibbin, M., Logan, C.V., Abdelhamed, Z.I., Muecke, J.S., Fernandez-Fuentes, N., Laurie, K.J., Shires, M., Fogarty, R., Carr, I.M., Poulter, J.A., Morgan, J.E., Mohamed, M.D., Jafri, H., Raashid, Y., Meng, N., Piseth, H., Toomes, C., Casson, R.J., Taylor, G.R., Hammerton, M., Sheridan, E., Johnson, C.A., Inglehearn, C.F., Craig, J.E. & Ali, M. (2011) Homozygous mutations in PXDN cause congenital cataract, corneal opacity, and developmental glaucoma. *Am J Hum Genet* **89**, 464-473.

94. Yan, X., Sabrautzki, S., Horsch, M., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Beckers, J., Hrabe de Angelis, M. & Graw, J. (2014) Peroxidase is essential for eye development in the mouse. *Hum Mol Genet* **23**, 5597-5614.
95. Tang, Y., Xu, Q., Peng, H., Liu, Z., Yang, T., Yu, Z., Cheng, G., Li, X., Zhang, G. & Shi, R. (2015) The role of vascular peroxidase 1 in ox-LDL-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Atherosclerosis* **243**, 357-363.
96. Bai, Y.P., Hu, C.P., Yuan, Q., Peng, J., Shi, R.Z., Yang, T.L., Cao, Z.H., Li, Y.J., Cheng, G. & Zhang, G.G. (2011) Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* **51**, 1492-1500.
97. Shi, R., Hu, C., Yuan, Q., Yang, T., Peng, J., Li, Y., Bai, Y., Cao, Z., Cheng, G. & Zhang, G. (2011) Involvement of vascular peroxidase 1 in angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* **91**, 27-36.
98. Li, T.T., Zhang, Y.S., He, L., Liu, B., Shi, R.Z., Zhang, G.G. & Peng, J. (2012) Inhibition of vascular peroxidase alleviates cardiac dysfunction and apoptosis induced by ischemia-reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 851-862.
99. Ma, Q.L., Zhang, G.G. & Peng, J. (2013) Vascular peroxidase 1: a novel enzyme in promoting oxidative stress in cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* **23**, 179-183.
100. Zhang, Y.S., He, L., Liu, B., Li, N.S., Luo, X.J., Hu, C.P., Ma, Q.L., Zhang, G.G., Li, Y.J. & Peng, J. (2012) A novel pathway of NADPH oxidase/vascular peroxidase 1 in mediating oxidative injury following ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* **107**, 266.
101. Li, H., Cao, Z., Moore, D.R., Jackson, P.L., Barnes, S., Lambeth, J.D., Thannickal, V.J. & Cheng, G. (2012) Microbicidal activity of vascular peroxidase 1 in human plasma via generation of hypochlorous acid. *Infect Immun* **80**, 2528-2537.
102. Peterfi, Z., Toth, Z.E., Kovacs, H.A., Lazar, E., Sum, A., Donko, A., Sirokmany, G., Shah, A.M. & Geiszt, M. (2014) Peroxidase-like protein: a novel peroxidase homologue in the human heart. *Cardiovasc Res* **101**, 393-399.
103. Gu, S.Q., Bakthavachalu, B., Han, J., Patil, D.P., Otsuka, Y., Guda, C. & Schoenberg, D.R. (2012) Identification of the human PMR1 mRNA endonuclease

- as an alternatively processed product of the gene for peroxidasin-like protein. *RNA* **18**, 1186-1196.
104. Weber, G., Rabbiosi, S., Zamproni, I. & Fugazzola, L. (2013) Genetic defects of hydrogen peroxide generation in the thyroid gland. *J Endocrinol Invest* **36**, 261-266.
 105. Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 786-801.
 106. Mouw, J.K., Ou, G. & Weaver, V.M. (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 771-785.
 107. Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M. & Barbarisi, A. (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* **199**, 174-180.
 108. Heino, J. & Kapyta, J. (2009) Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des* **15**, 1309-1317.
 109. Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**, 33-43.
 110. Lu, P., Weaver, V.M. & Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395-406.
 111. Yurchenco, P.D. (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
 112. Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-433.
 113. Iozzo, R.V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest* **108**, 165-167.
 114. Frantz, C., Stewart, K.M. & Weaver, V.M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4195-4200.
 115. Schaefer, L. & Schaefer, R.M. (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* **339**, 237-246.
 116. Ricard-Blum, S. & Ruggiero, F. (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* **53**, 430-442.
 117. Wise, S.G. & Weiss, A.S. (2009) Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 494-497.

118. Stanton, H., Melrose, J., Little, C.B. & Fosang, A.J. (2011) Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 1616-1629.
119. Pankov, R. & Yamada, K.M. (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-3863.
120. Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S. & Vogel, V. (2007) Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol* **5**, e268.
121. Ghert, M.A., Qi, W.N., Erickson, H.P., Block, J.A. & Scully, S.P. (2001) Tenascin-C splice variant adhesive/anti-adhesive effects on chondrosarcoma cell attachment to fibronectin. *Cell Struct Funct* **26**, 179-187.
122. Durbeej, M. (2010) Laminins. *Cell Tissue Res* **339**, 259-268.
123. Lucero, H.A. & Kagan, H.M. (2006) Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2304-2316.
124. Mott, J.D. & Werb, Z. (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 558-564.
125. Cruz-Munoz, W. & Khokha, R. (2008) The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Crit Rev Clin Lab Sci* **45**, 291-338.
126. White, J.M. (2003) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 598-606.
127. Villa, J.P., Bertenshaw, G.P., Bylander, J.E. & Bond, J.S. (2003) Meprin proteolytic complexes at the cell surface and in extracellular spaces. *Biochem Soc Symp*, 53-63.
128. Xian, X., Gopal, S. & Couchman, J.R. (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* **339**, 31-46.
129. Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.
130. Orkin, R.W., Gehron, P., McGoodwin, E.B., Martin, G.R., Valentine, T. & Swarm, R. (1977) A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* **145**, 204-220.

131. Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Liotta, L.A., Robey, P.G., Tryggvason, K. & Martin, G.R. (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188-6193.
132. Behrens, D.T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P. & Hansen, U. (2012) The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J Biol Chem* **287**, 18700-18709.
133. Miosge, N., Heinemann, S., Leissling, A., Klenczar, C. & Herken, R. (1999) Ultrastructural triple localization of laminin-1, nidogen-1, and collagen type IV helps elucidate basement membrane structure in vivo. *Anat Rec* **254**, 382-388.
134. Miner, J.H. & Li, C. (2000) Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev Biol* **217**, 278-289.
135. Mitsuhashi, Y. & Hashimoto, I. (2003) Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol Res* **295 Suppl 1**, S29-33.
136. Lampe, A.K. & Bushby, K.M. (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet* **42**, 673-685.
137. Kosodo, Y. & Huttner, W.B. (2009) Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ* **51**, 251-261.
138. Rowe, R.G. & Weiss, S.J. (2008) Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol* **18**, 560-574.
139. Riedle, B. & Kerjaschki, D. (1997) Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol* **151**, 215-231.
140. Kennett, E.C. & Davies, M.J. (2009) Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation. *Free Radic Biol Med* **47**, 389-400.
141. Davies, M.J. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 93-109.

142. Kennett, E.C., Chuang, C.Y., Degendorfer, G., Whitelock, J.M. & Davies, M.J. (2011) Mechanisms and consequences of oxidative damage to extracellular matrix. *Biochem Soc Trans* **39**, 1279-1287.
143. Woods, A.A. & Davies, M.J. (2003) Fragmentation of extracellular matrix by hypochlorous acid. *Biochem J* **376**, 219-227.
144. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Jr. & Krause, K.H. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* **142**, w13659.
145. Kim, Y.W., West, X.Z. & Byzova, T.V. (2013) Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J Mol Med (Berl)* **91**, 323-328.
146. Kim, Y.W. & Byzova, T.V. (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* **123**, 625-631.
147. Liou, G.Y. & Storz, P. (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* **44**, 479-496.
148. Sugamura, K. & Keaney, J.F., Jr. (2011) Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* **51**, 978-992.
149. Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. & Malik, A.B. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* **20**, 1126-1167.
150. Richter, K., Konzack, A., Pihlajaniemi, T., Heljasvaara, R. & Kietzmann, T. (2015) Redox-fibrosis: Impact of TGFbeta1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol* **6**, 344-352.
151. Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M. & Lambeth, J.D. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* **154**, 879-891.
152. Donko, A., Peterfi, Z., Sum, A., Leto, T. & Geiszt, M. (2005) Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 2301-2308.
153. Meitzler, J.L., Brandman, R. & Ortiz de Montellano, P.R. (2010) Perturbed heme binding is responsible for the blistering phenotype associated with mutations in the *Caenorhabditis elegans* dual oxidase 1 (DUOX1) peroxidase domain. *J Biol Chem* **285**, 40991-41000.

154. Foerder, C.A. & Shapiro, B.M. (1977) Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 4214-4218.
155. Kay, E.S. & Shapiro, B.M. (1987) Ovoperoxidase assembly into the sea urchin fertilization envelope and dityrosine crosslinking. *Dev Biol* **121**, 325-334.
156. Wong, J.L., Creton, R. & Wessel, G.M. (2004) The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase Udx1. *Dev Cell* **7**, 801-814.
157. Wong, J.L. & Wessel, G.M. (2005) Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development. *Dev Biol* **288**, 317-333.
158. DeNichilo, M.O., Panagopoulos, V., Rayner, T.E., Borowicz, R.A., Greenwood, J.E. & Evdokiou, A. (2015) Peroxidase enzymes regulate collagen extracellular matrix biosynthesis. *Am J Pathol* **185**, 1372-1384.
159. Rees, M.D., Dang, L., Thai, T., Owen, D.M., Malle, E. & Thomas, S.R. (2012) Targeted subendothelial matrix oxidation by myeloperoxidase triggers myosin II-dependent de-adhesion and alters signaling in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **53**, 2344-2356.
160. Rees, M.D., Kennett, E.C., Whitelock, J.M. & Davies, M.J. (2008) Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med* **44**, 1973-2001.
161. Wang, Y., Rosen, H., Madtes, D.K., Shao, B., Martin, T.R., Heinecke, J.W. & Fu, X. (2007) Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* **282**, 31826-31834.
162. Rudolph, V., Andrie, R.P., Rudolph, T.K., Friedrichs, K., Klinke, A., Hirsch-Hoffmann, B., Schwoerer, A.P., Lau, D., Fu, X., Klingel, K., Sydow, K., Didie, M., Seniuk, A., von Leitner, E.C., Szoecs, K., Schrickel, J.W., Treede, H., Wenzel, U., Lewalter, T., Nickenig, G., Zimmermann, W.H., Meinertz, T., Boger, R.H., Reichenspurner, H., Freeman, B.A., Eschenhagen, T., Ehmke, H., Hazen, S.L., Willems, S. & Baldus, S. (2010) Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat Med* **16**, 470-474.

163. Vahedi, K. & Alamowitch, S. (2011) Clinical spectrum of type IV collagen (COL4A1) mutations: a novel genetic multisystem disease. *Curr Opin Neurol* **24**, 63-68.
164. Poschl, E., Schlotzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. & Mayer, U. (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619-1628.
165. Kiss, M., Kiss, A.A., Radics, M., Popovics, N., Hermes, E., Csiszar, K. & Mink, M. (2016) Drosophila type IV collagen mutation associates with immune system activation and intestinal dysfunction. *Matrix Biol* **49**, 120-131.
166. Borchiellini, C., Coulon, J. & Le Parco, Y. (1996) The function of type IV collagen during Drosophila muscle development. *Mech Dev* **58**, 179-191.
167. Sibley, M.H., Graham, P.L., von Mende, N. & Kramer, J.M. (1994) Mutations in the alpha 2(IV) basement membrane collagen gene of Caenorhabditis elegans produce phenotypes of differing severities. *EMBO J* **13**, 3278-3285.
168. Peterfi, Z. & Geiszt, M. (2014) Peroxidasins: novel players in tissue genesis. *Trends Biochem Sci* **39**, 305-307.
169. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539.
170. Seki, T., Naito, I., Oohashi, T., Sado, Y. & Ninomiya, Y. (1998) Differential expression of type IV collagen isoforms, alpha5(IV) and alpha6(IV) chains, in basement membranes surrounding smooth muscle cells. *Histochem Cell Biol* **110**, 359-366.
171. Gunwar, S., Ballester, F., Noelken, M.E., Sado, Y., Ninomiya, Y. & Hudson, B.G. (1998) Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J Biol Chem* **273**, 8767-8775.
172. Boutaud, A., Borza, D.B., Bondar, O., Gunwar, S., Netzer, K.O., Singh, N., Ninomiya, Y., Sado, Y., Noelken, M.E. & Hudson, B.G. (2000) Type IV collagen

- of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J Biol Chem* **275**, 30716-30724.
173. Wieslander, J., Barr, J.F., Butkowski, R.J., Edwards, S.J., Bygren, P., Heinegard, D. & Hudson, B.G. (1984) Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3838-3842.
 174. Borza, D.B., Neilson, E.G. & Hudson, B.G. (2003) Pathogenesis of Goodpasture syndrome: a molecular perspective. *Semin Nephrol* **23**, 522-531.
 175. Vanacore, R.M., Ham, A.J., Cartailier, J.P., Sundaramoorthy, M., Todd, P., Pedchenko, V., Sado, Y., Borza, D.B. & Hudson, B.G. (2008) A role for collagen IV cross-links in conferring immune privilege to the Goodpasture autoantigen: structural basis for the crypticity of B cell epitopes. *J Biol Chem* **283**, 22737-22748.
 176. Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. & Neilson, E.G. (2003) Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* **348**, 2543-2556.
 177. Koliakos, G.G., Kouzi-Koliakos, K., Furcht, L.T., Reger, L.A. & Tsilibary, E.C. (1989) The binding of heparin to type IV collagen: domain specificity with identification of peptide sequences from the alpha 1(IV) and alpha 2(IV) which preferentially bind heparin. *J Biol Chem* **264**, 2313-2323.
 178. Tsilibary, E.C., Koliakos, G.G., Charonis, A.S., Vogel, A.M., Reger, L.A. & Furcht, L.T. (1988) Heparin type IV collagen interactions: equilibrium binding and inhibition of type IV collagen self-assembly. *J Biol Chem* **263**, 19112-19118.
 179. Boosani, C.S. & Sudhakar, Y.A. (2011) Proteolytically Derived Endogenous Angiainhibitors Originating from the Extracellular Matrix. *Pharmaceuticals (Basel)* **4**, 1551-1577.
 180. Sundaramoorthy, M., Meiyappan, M., Todd, P. & Hudson, B.G. (2002) Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J Biol Chem* **277**, 31142-31153.

181. Nomizu, M., Utani, A., Beck, K., Otaka, A., Roller, P.P. & Yamada, Y. (1996) Mechanism of laminin chain assembly into a triple-stranded coiled-coil structure. *Biochemistry* **35**, 2885-2893.
182. Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S.V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-88.
183. Mayer, G., Boileau, G. & Bendayan, M. (2004) Sorting of furin in polarized epithelial and endothelial cells: expression beyond the Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem* **52**, 567-579.
184. Simmen, T., Nobile, M., Bonifacino, J.S. & Hunziker, W. (1999) Basolateral sorting of furin in MDCK cells requires a phenylalanine-isoleucine motif together with an acidic amino acid cluster. *Mol Cell Biol* **19**, 3136-3144.
185. Molloy, S.S., Thomas, L., VanSlyke, J.K., Stenberg, P.E. & Thomas, G. (1994) Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J* **13**, 18-33.
186. Ceko, M.J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W., James, S.A., Kirby, J.K., Rodgers, R.J. & Harris, H.H. (2015) Distribution and speciation of bromine in mammalian tissue and fluids by X-ray fluorescence imaging and X-ray absorption spectroscopy. *Metallomics* **7**, 756-765.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapját képező publikációk:

1. **Lázár E**, Péterfi Z, Sirokmány G, Kovács HA, Klement E, Medzihradszky KF, Geiszt M. (2015) Structure-function analysis of peroxidasin provides insight into the mechanism of collagen IV crosslinking. *Free Radic Biol Med*, 83: 273-82.
IF: 5,736
2. Péterfi Z, Tóth ZE, Kovács HA, **Lázár E**, Sum A, Donkó A, Sirokmány G, Shah AM, Geiszt M. (2014) Peroxidasin-like protein: a novel peroxidase homologue in the human heart. *Cardiovasc Res*, 101(3): 393-9.
IF: 5,940

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Geiszt Miklósnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy PhD hallgatóként bekapcsolódjak a laboratóriumában folyó magas színvonalú kutatómunkába. Értékes szakmai vezetése és kifogyhatatlan ötletei mellett kiemelten hálás vagyok mindig előremutató, optimista szemléletéért, amivel szakmai és személyes fejlődésemhez is nagyban hozzájárult.

Köszönöm Prof. Hunyady Lászlónak, hogy kezdetben tudományos diákköri, majd PhD hallgatóként az általa vezetett Élettani Intézetbe fogadott, lehetővé téve, hogy tudományos munkámat ebben a kiemelkedő szakmaiságú közegben végezhessem.

Köszönettel tartozom Prof. Ligeti Erzsébetnek, akinek laborjában először nyertem betekintést az élettudományi kutatás világába, és aki a későbbiekben PhD programunk vezetőjeként is figyelemmel kísérte előrehaladásomat, valamint munkatársainak, Dr. Csépanyi-Kömi Rolandnak és Dr. Lőrincz M. Ákosnak, akiktől a laboratóriumi technikák alapjait sajátíthattam el.

Hálával gondolok a Geiszt labor valamennyi tagjára, akik lelkesedése élménnyé tette a közös munkát, szorgalma és kitartása pedig engem is jobb teljesítményre motivált. Kutatásomhoz rengeteg elméleti és gyakorlati segítséget kaptam Dr. Sirokmány Gábortól és Dr. Péterfi Zalántól, akik tudományos igényességére és támogató hozzáállására egyaránt példaképpen tekintek. Hálás vagyok laboratóriumi asszisztensünknek, Molnár Beátának kísérleteim előkészítésében és megvalósításában nyújtott precíz és lelkiismeretes munkájáért. Köszönettel tartozom Dr. Kovács Hajnal és Zana Melinda PhD hallgató társaimnak, Patus Eszter és Mihálffy Máté tudományos diákköri hallgatóinknak, illetve munkacsoportunk további tagjainak, Dr. Donkó Ágnesnek, Trencsényiné Dr. Balázs Bernadettnek és Dr. Petheő Gábornak a gondolatébresztő beszélgetésekért és tanácsaikért, valamint egyes kísérletek kivitelezésében nyújtott értékes segítségükért.

Köszönet illeti az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának proteomikai kutatócsoportjában dolgozó együttműködő partnereinket, Dr. Klement Évát és Dr. Medzihradsky Katalint a tömegspektrometriai mérések kivitelezéséért és értékeléséért, valamint a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetének munkatársait, Dr. Lányi Árpádot és Orosz-Tóth Katalint antitestfejlesztési projektjeinkben nyújtott elméleti és gyakorlati segítségükért.

Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi munkatársának a közös élményeket és a barátságos légkört, amiben egyszerre lehetett hatékonyan és jó hangulatban dolgozni.

Végezetül szeretném megköszönni férjemnek, családomnak és barátaimnak szeretetüket, támogatásukat és türelmüket, melyek nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.