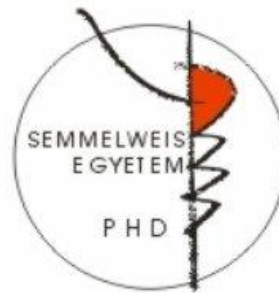


# Az emlős peroxidazin fehérje szerkezet-funkció vizsgálata

Doktori tézisek

**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

## 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 fiziológiás jelenségben, köztük az extracelluláris mátrix (ECM) szerkezetének kialakításában is központi szerepet játszanak. A ROS különböző megjelenési formái közül is kiemelt jelentőséggel bíró hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) legrészletesebben tanulmányozott hatásait peroxidáz enzimek közreműködésével fejtjük ki. Az emlősökben is kifejeződő, ismert hem-peroxidázok, a mieloperoxidáz (MPO), eozinofil peroxidáz (EPX), laktoperoxidáz (LPO) és tireoperoxidáz (TPO), valamint a ciklooxygenáz 1 és 2 enzimek (COX1, COX2) nagyfokú szekvenciabeli hasonlósággal és azonos katalitikus ciklussal jellemezhetőek. Doktori munkám során az állati hem-peroxidázok legújabbán azonosított képviselőjének, a peroxidazinnak (PXDN) és funkcióvesztéses mutáns homológjának, a peroxidazin-szerű fehérjének (PXDNL) vizsgálatával foglalkoztam

A PXDN különleges szerkezettel bír, hiszen peroxidázaktivitásaért felelős katalitikus doménje mellett más, a mátrixproteinekre jellemző strukturális elemek is megtalálhatóak a fehérjében. N-terminálisan elhelyezkedő szekréción szignál szekvenciáját hat leucin-gazdag ismétlődés (LRR) és négy immunglobulin C2-szerű domén (Ig C2) követi, a fehérje C-terminálisan pedig egy  $\alpha$ -helikális régió szomszédságában egy von Willebrand faktor C-típusú domén (vWF C) helyezkedik el. A PXDN-t elsőként *Drosophila melanogaster*-ben írták le, később azonban az állatvilág számos eltérő fejlettségi szintjén álló fajaiban is kimutatták a fehérje jelenlétét. Az ecetmuslicában kifejeződő PXDN az állat hemocitáiból homotrimerként kerül szekréción az extracelluláris térbe, az oligomer forma kialakulásának mechanizmusáról és az abban résztvevő molekulaszakaszok helyzetéről azonban ezidáig nem rendelkezünk információval. A humán PXDN-t elsőként melanómaasszociált géntermékként írták le, később azonban számos sejtvonalban és szövetek széles körében is igazolták a PXDN expresszióját. Munkacsoportunkhoz köthető a PXDN szívspecifikusan kifejeződő homológjának, a peroxidazin-szerű fehérjének (PXDNL) azonosítása és első részletes jellemzése is. A PXDNL a PXDN-nel szemben nem

rendelkezik mérhető peroxidázaktivitással, amiért a fehérje szekvenciájában jelenlévő két, az emlős hem-peroxidázokban a hem kötéséért felelős, konzervált aminosavat érintő eltérés tehető felelőssé.

A PXDN és a PXDNL élő szervezetben betöltött funkciójáról ezidáig kevés ismerettel rendelkezünk, de a PXDN-nel kapcsolatban kezdettől azt valószínűsítették, hogy az az ECM oxidatív módosítására specializálódott enzimeként töltheti be fiziológiás funkcióját. Alacsonyabbrendű élőlények (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus tropicalis*) számos különböző fejlődési stádiumaiban igazolták a PXDN részvételét egyes ECM struktúrák megformálásában, munkacsoportunk pedig korábbi közleményében az egér vese uréterlekötés következtében létrejövő fibrotikus átalakulása során mutatta ki a fehérje feldúsulását az extracelluláris térben. Több olyan tanulmány is ismert, amelyben komplex szemfejlődési és mozgatórendszeri rendellenességekben érintett betegek genetikai vizsgálata során a *pxdn* gén mutációját azonosították az eltérések mögött álló kóroki tényezőként. Az anterior szegment diszgenézis (ASD) néven összefoglalt, heterogén megjelenésű szemészeti kórképet ezt követően PXDN-deficiens egértörzs felhasználásával részletesen is jellemezték. Habár ezek a megfigyelések alátámasztották a korábbi feltételezéseket a PXDN ECM homeosztázisban betöltött központi szerepéről, mégis igen kevés részletet sikerült felderíteni azokról a molekuláris mechanizmusokról, amelyek a PXDN közreműködésével befolyásolják ennek a rendkívül összetett fehérjehálózatnak az integritását.

A kutatási területen áttörést jelentett a PXDN-hez köthető első, fiziológiásan is megjelenő enzimreakció felfedezése, amely az ECM specializált formáját képviselő bazális membránokban megy végbe. A bazális membránok endotél és epitel sejtek alatt, valamint izomsejtek, zsírsejtek és perifériás idegrostok körül elhelyezkedő, lapszerű képződmények, melyek strukturális támaszt biztosítanak és az extracelluláris térből származó jelzéseket közvetítenek a hozzájuk kapcsolódó sejtek számára. A bazális membránok legnagyobb mennyiségben jelenlévő alkotója a kollagén IV, amely szintézisét követően többlépcsős oligomerizációs folyamaton megy keresztül. A hat különböző kollagén IV izoformának megfelelő  $\alpha$ -láncok három doménre, az N-terminális 7S szakaszra, a hosszú kollagenózus doménre és a C-terminálisan elhelyezkedő NC1 doménre oszlanak. A kollagén IV funkcionális alegységeit az ún.

protomerek jelentik, amelyek három  $\alpha$ -lánc összerendeződésével alakulnak ki, és amelyeket több másodrendű és kovalens kötés szilárdít meg és kapcsol egymáshoz. Két protomer összefekvő NC1 doménjei hexamer szerkezetet alkotnak, a 7S doméneken keresztül pedig további tetramer komplexek alakulnak ki, ami végül a kétdimenziós kollagén IV hálózat kiépüléséhez vezet.

A közelmúltban derült fény arra, hogy a kutatásunk középpontjában álló PXDN kovalens keresztkötést létesít az ECM-ben összerendeződő két kollagén IV protomer szemben fekvő NC1 doménjei között, amivel hozzájárul a funkcionálisan teljesértékű kollagén IV hálózat kialakulásához. A  $H_2O_2$ -ből és bromidionból képzett hipobrómosav (HOBr) felhasználásával zajló folyamatban kovalens szulfilimin kötés létesül az NC1 doménben konzervált, 93. pozíciót elfoglaló metionin és a 211. helyen található hidroxilizin vagy lizin oldalláncai között. Ez a katalitikus folyamat több szempontból is különleges: a létrejövő szulfiliminkötést elsőként mutatták ki biológiai rendszerben, a reakció pedig a bróm élő szervezetben betöltött esszenciális szerepének ezidáig hiányzó bizonyítékául szolgál.

Ezt az eredményt elsősorban olyan *in vitro* kísérleti adatok támasztják alá, amelyek a PFHR-9 embrionális karcinóma sejtvonal peroxidázinhibitorokkal történő farmakológiai gátlásán, illetve a heterológ expressziós rendszerben kifejezett, rekombináns humán PXDN fehérje biokémiai analízisén alapulnak. A PXDN által katalizált keresztkötés *in vivo* jelentőségét ezidáig csak *Drosophila melanogaster*ben és *Danio rerio*ban igazolták. Ugyan a reakció résztvevőinek nagyfokú evolúciós konzerváltsága alapján feltételezhető, hogy a keresztkötési folyamat az állatvilág különböző szintjein azonos mechanizmussal mehet végbe, említsökből származó kísérleti adatok ezidáig nem álltak rendelkezésünkre ennek az igazolására. Szintén nem ismert, hogy a PXDN számos doménje hogyan járul hozzá a negyedleges szerkezet és a fehérjéhez köthető működések, így többek között a kollagén IV keresztkötési reakció kivitelezéséhez. Az sem tisztázott, hogy a kollagén IV keresztkötési reakció kiesése a PXDN hiányában korábban több állatfajban is megfigyelt számos fenotípusbeli eltérésnek mekkora részéért felelős, és hogy azokhoz más potenciális extracelluláris szubsztrátok oxidációja és a fehérje által a mátrixban betöltött strukturális szerep milyen mértékben járulhat hozzá.

## CÉLKITŰZÉSEK

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 konstruktok segítségével végzett struktúra-funkció analízissel terveztük felderíteni. Vizsgálataink eredményei alapján a nagymértékben homológ PXDNL szerkezetével és működésével kapcsolatban is szerettünk volna következtetéseket levonni.

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

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

## MÓDSZEREK

*Rekombináns humán PXDN és PXDNL konstruktok klónozása:* A vad típusú humán PXDN-t és PXDNL-t kódoló plazmidokból kiindulva számos, pontmutációkat vagy doméneléciókat hordozó, V5-tag-gel jelölt rekombináns fehérjekonstruktot hoztunk létre. A trunkált formák esetében TA klónozással illesztettük PXDN kódoló régiójának egyes szakaszait a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba, a helyspecifikus nukleotidcseréket pedig a célzott mutációkat tartalmazó, komplementer oligonukleotid párokkal végzett PCR reakciókban hoztuk létre.

*PXDN-hiányos egértörzs készítése és tenyésztése:* Laborunk megrendelésére a SAGE Laboratories cink-ujjas endonukleáz (ZFN) technológia alkalmazásával PXDN-deficiens C57BL/6 egértörzset hozott létre. Heterozigóta tenyészpárok időzített pároztatását követően 13 nappal a vemhes nőstények méhéből begyűjtöttük az embriókat, melyekből ezt követően egér embrionális fibroblasztokat (MEF) izoláltunk.

*Sejtenyésztés és sejtkultúrán végzett kísérletek:* A rekombináns PXDN és PXDNL fehérjéket HEK293 freestyle (FS) és Cos7 sejtekben fejeztük ki, melyekbe Lipofectamine LTX és Plus reagenssekkkel juttattuk be az expressziós konstruktokat. A transzfektált HEK293FS sejtek genetikinnel történő szelekciójával a rekombináns humán PXDN-V5-öt stabilan expresszáló sejtvonalat hoztunk létre. Az endogén humán PXDN-t humán umbilikális véna endotél sejtekben (HUVEC) mutattuk ki, ahol phloroglucinol (PhG) általános peroxidáz-gátlószer alkalmazásával vizsgáltuk a fehérje kollagén IV keresztkötő aktivitását. A PXDN genetikai eredetű hiányának következményeit vad típusú és PXDN-deficiens egér embrionális fibroblasztok (MEF) segítségével értékeltük. A PXDN konstrukttal végzett funkciómentő („rescue”) kísérleteinkben Neon transzfekciós rendszerrel történő elektroporációval juttattuk a vizsgálni kívánt plazmidokat a PXDN-hiányos MEF sejtekbe.

*A PXDN oligomerizációjának vizsgálata:* A PXDN oligomerizációját N-etilmaleimid tiolalkiláló reagenssel történő előkezelést követően HUVEC, MEF, valamint tranziensen transzfektált HEK293FS sejtek teljes sejtlizátumában vizsgáltuk. A

redukálószer hozzáadása nélkül nyert mintákból készített Western blotban a monomer, dimer és trimer formák molekulatömegének megfelelően megjelenő PXDN- vagy V5-specifikus jel alapján értékeltük a vizsgált PXDN forma oligomerizációs képességet.

*A kollagén IV profil és NC1 keresztkötés vizsgálata:* A vizsgálni kívánt sejttenyészetet hipotóniás lízispufferben vettük fel, majd a mátrixba beépült kollagén IV molekulákból kollagenáz enzim segítségével szabadítottuk fel az NC1 doméneket. A kollagenázzal emésztett mintákban SDS-PAGE-sel választottuk szét a keresztkötött dimer és monomer NC1 doméneket, amelyeket a blottolást követően izoforma-specifikus antitestekkel, 55 és 25 kDa környéki magasságokban mutattunk ki. A rekombináns PXDN konstruktok kollagén IV keresztkötő képességét PXDN-hiányos MEF sejtek transzfekcióját követően, funkciómentő („rescue”) vizsgálatokban teszteltük.

*A PXDN szekréciójának vizsgálata:* A rekombináns PXDN konstruktok szekrécióját tranziensen transzfektált Cos7 sejtek teljes sejtlizátumának és felülúszójának Western blot analízisével hasonlítottuk össze. A minták PXDN tartalmát V5-specifikus antitesttel kapott jel alapján értékeltük. A sejtlizátumok esetében a felvitt minták egyenletes fehérjetartalmát, a médiumban pedig a sejtes szennyeződés hiányát az aktintartalom vizsgálatával igazoltuk.

*Western blot és immunprecipitáció:* A redukálószer hozzáadásával vagy anélkül kezelt fehérjemintákat saját készítésű poliklonális  $\alpha$ -hsPXDN vagy  $\alpha$ -mmPXDN, valamint monoklonális  $\alpha$ -NC1 kollagén IV,  $\alpha$ -V5 vagy  $\alpha$ - $\beta$ -aktin ellenanyagokkal előhívott Western blotban vizsgáltuk. A rekombináns PXDN-V5-tartalmú fehérjekomplexeket anti-V5 agaróz affinitásgéllal izoláltuk a fehérjét stabilan expresszáló HEK293FS sejtvonalból. A HUVEC sejtekben kialakuló, PXDN-t tartalmazó fehérjekomplexeket a tisztított poliklonális  $\alpha$ -hsPXDN ellenanyaggal precipitáltuk, melyeket ezt követően protein G agaróz gyöngy segítségével kötöttünk meg.

*Tömegspektrometriai analízis:* Az immunprecipitációval izolált, PXDN-tartalmú fehérjekomplexek összetételének meghatározásához a minták emésztésével nyert triptikus peptideket együttműködő partnereink LC-MS/MS vizsgálatban elemezték,

majd a kapott adatokat Mascot szerver segítségével vetették össze az NCBI legfrissebben elérhető nem redundáns protein adatbázisával.

*Immunfluoreszcens jelölések és konfokális mikroszkópia:* A PXDN és PXDNL konstruktok lokalizációját tranziensen transzfektált Cos7 és PXDN-deficiens MEF sejtek PFA-val fixált mintáin vizsgáltuk. A permeabilizáló oldattal vagy anélkül kezelt sejtekben indirekt jelöléssel,  $\alpha$ -hsPXDN vagy  $\alpha$ -V5 ellenanyaggal történő inkubálást követően Alexa Fluor 488 vagy 568 másodlagos antitesttel tettük láthatóvá a rekombináns fehérjéket. Az így kapott mintákról ezt követően LSM 710 konfokális mikroszkóppal, 63x nagyítású objektív segítségével készítettünk felvételeket.

*Peroxidázaktivitás mérése:* A rekombináns PXDN konstruktok *in vitro* enzimaktivitását tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumának Amplex Red peroxidáz mérésben mutatott értékei alapján hasonlítottuk össze. A reakció során keletkező rezorufin fluoreszcenciáját 590 nm-en, POLARstar OPTIMA 96-lyukú microplate olvasóval detektáltuk.

*Többszörös aminosavszekvencia-illesztés:* A humán hem-peroxidázok, különböző fajokból származó PXDN szekvenciák, valamint a humán PXDN és PXDNL többszörös szekvenciaillesztését a Clustal Omega szoftver segítségével végeztük el.

*Statisztikai analízis:* A dolgozatban bemutatott ábrák mindegyike legalább három független kísérlet egybehangzó eredményét demonstrálja. Az Amplex Red peroxidáz mérésben kapott adatok értékeléséhez a GraphPad PRISM 5 szoftver segítségével egyutas ANOVA próbát végeztünk, majd Sidak-féle post-hoc tesztekkel hasonlítottuk össze az egyes konstruktok enzimaktivitását. Az eredményeket  $p < 0,05$  esetében tekintettük szignifikánsnak.



## EREDMÉNYEK

Az endogén emlős PXDN kollagén IV keresztkötési képességének vizsgálatához humán és egér szövetből származó primer sejtenyészeteket használtunk fel. A humán umbilikális véna endotél sejtek (HUVEC) esetében phloroglucinol (PhG) nevű általános peroxidáz-gátlószer alkalmazásával teszteltük a PXDN enzimaktivitásának szerepét a keresztkötési folyamatban. A HUVEC sejtek a kollagén IV  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  izoformáját nagy, az  $\alpha 5$  láncot pedig kisebb mennyiségben fejezik ki. Western blot kísérleteink alapján a PhG kezelés nem befolyásolta az endogén PXDN fehérjeszintű expresszióját, azonban drasztikusan lecsökkentette a kimutatható NC1 dimerek mennyiségét a HUVEC sejtek kollagenázzal emésztett lizátumában. A farmakológiai megközelítéssel kapott eredményeket lehetőségünk volt genetikai bizonyítékkal is megerősíteni, amihez PXDN-deficiens, illetve vad típusú egérembriókból származó fibroblasztokat (MEF) használtunk fel. Amíg a vad típusú sejtek kollagenázzal kezelt mintáiban erős  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  dimer NC1 csíkokat detektáltunk, a keresztkötött forma teljesen hiányzott a PXDN-deficiens lizátumokból készült Western blotokon. Eredményeink arra utalnak, hogy *in vitro* körülmények között a PXDN enzimaktivitása a vizsgált primer emlős sejtekben is elengedhetetlen a kollagén IV NC1 doménjeinek kovalens keresztkötéséhez.

Az emlős PXDN negyedleges szerkezetét HUVEC sejtekben, illetve V5-tag-gel ellátott, rekombináns humán PXDN-t kifejező stabil HEK293FS sejtekben vizsgáltuk. A sejtek nem redukált lizátumaiból készült Western blot kísérletekben három PXDN-tartalmú sávot detektáltunk 160, 300 és 500 kDa-os molekulatömeg környékén, amelyek közül a legmagasabb adta a legintenzívebb jelet. A lizátumok  $\beta$ -merkaptóetanollal történő kezelésének hatására az említett komplexek szétestek és csak a monomer PXDN molekulatömegének megfelelő, 165 kDa-os magasságban észleltünk PXDN-specifikus jelet. A PXDN-tartalmú komplexek összetételének meghatározásához azokat immunprecipitációval izoláltuk az említett sejtek lizátumából. A stabil HEK293FS sejtvonalból  $\alpha$ -V5 antitesttel tisztított fehérjemintában a korábban látott három molekulatömegnek, 500, 300 és 160 kDa-nak megfelelő magasságban mutattunk ki fehérjekomplexeket a szétválasztásra használt SDS-poliakrilamid-gél Coomassie-festését követően. A fehérjesávok proteomikai analízise mindhárom minta esetében a PXDN-t azonosította azok egyedüli összetevőjeként. A HUVEC sejtekben detektált 500

kDa-os PXDN-tartalmú fehérjekomplex tisztítását követően annak tömegspektrometriai vizsgálata is azonos eredményre vezetett. Ezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az emlős PXDN a *Drosophila* fehérjéhez hasonlóan redukcióra érzékeny homotrimert formál, és a vizsgált komplexek az oligomerizációs folyamat egyes állomásainak felelnek meg. További kísérleteinkben a homotrimer összeépülésének mechanizmusát rekombináns PXDN konstruktok segítségével derítettük fel.

A PXDN oligomerformálása és endogén peroxidázaktivitása közötti kapcsolat vizsgálatához a vad típusú PXDN irányított mutagenézisével funkcióvesztéses mutáns konstruktot klónoztunk. Ehhez két, a katalitikus aktivitás szempontjából esszenciális reziduomot a PXDNL szekvenciájának azonos pozíciójában található aminosavakra cseréltünk, így létrehozva a Q823W, D826E fehérjét. A mutáns fehérje *in vitro* enzimaktivitását tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumával végzett Amplex Red peroxidáz mérésben értékeltük. A bevitt mutációk valóban megszüntették a Q823W, D826E konstrukt peroxidázaktivitását, ez azonban nem akadályozta meg a rekombináns fehérje trimerképzését tranziensen transzfektált HEK293FS sejtekben. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PXDN endogén peroxidázaktivitása nem szükséges a trimer negyedleges szerkezet kialakításához.

Következő lépésként szeretnénk volna azonosítani a PXDN azon szakaszait, amelyek szerepet játszanak a fehérje homotrimer formájának összeépülésében és stabilizálásában. Ehhez első megközelítésben doménhiányos PXDN konstruktokat klónoztunk, melyek oligomerizációs képességét tranziensen transzfektált HEK293FS sejtekben vizsgáltuk. A redukálószerrel nem kezelt sejt-lizátumok Western blot vizsgálata azt mutatta, hogy az N-terminális szekréciós szignál szekvencia megtartottsága esetén sem a vWF C domén, sem a LRR és Ig C2 régiók hiánya nem gátolta meg a PXDN oligomerizációját. Ez arra utal, hogy a homotrimer három alegységének összekapcsolódását a humán PXDN 696. és 1412. aminosava közé eső fehérjeszakasz mediálja, amely a peroxidáz domén kezdetétől az  $\alpha$ -helikális régió végéig húzódó szegmensnek felel meg.

A PXDN homotrimer redukálószer-érzékenysége arra utalt, hogy a fehérjekomplex stabilizálásáért diszulfidhidak lehetnek a felelősek. A humán PXDN és a többi hem-peroxidáz szekvenciájának összehasonlításával négy olyan ciszteint azonosítottunk a PXDN 736., 1315., 1316. és 1319. pozícióiban, amelyek

feltételezhetően nem vesznek részt a fehérjélcón belüli diszulfidhidak kialakításában, így alkalmasak lehetnek a homotrimert stabilizáló intermolekuláris kötések létesítésére. Ezek helyspecifikus mutagenézisével cisztein-szerin mutáns konstruktokat hoztunk létre, melyeket HEK293FS sejtekben fejeztük ki. A sejtek nem redukált lizátumából készült Western blotok alapján az 1316. és 1319. ciszteinek külön és együttes mutációja sem befolyásolta a rekombináns PXDN trimerizációját. Ezzel szemben C736S és a C1315S konstruktok esetében az 500 kDa környéki komplex eltűnt, és a monomer mellett a dimer formának megfelelő magasságban kaptunk erős jeleket, a két cisztein együttes hiánya pedig az oligomerképzés teljes elmaradásához vezetett. Ezek a kísérletek arra utaltak, hogy PXDN homotrimer szerkezetét megerősítő diszulfidhidak a 736. és az 1315. cisztein között alakulnak ki. Az utóbbi két ciszteint az állatvilág eltérő fejlettségi szintjein álló fajok (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus tropicalis*, *Mus musculus*) PXDN szekvenciáiban is konzervált pozícióban találtuk. Ez azt valószínűsíti, hogy a PXDN trimerformálása a vizsgált fajok között megőrzött mechanizmussal, a humán szekvencia 736. és 1315. ciszteinjeinek megfelelő reziduumokon keresztül valósulhat meg.

A PXDN ismert funkcióinak szerkezeti feltételeit az eddig bemutatott rekombináns konstruktokkal végzett struktúra-funkció vizsgálatokban igyekeztünk feltárni. A PXDN szekréciójához szükséges fehérjerégiók felderítése céljából módosított szekvenciájú PXDN konstruktok tranziens transzfekcióját követően Cos7 sejtek médiumban vizsgáltuk a rekombináns fehérjék megjelenését. Ezek minden egyéb szerkezeti jellemzőjüktől függetlenül detektálhatóak voltak a sejtek felülúszójában, ha N-terminális végükön megőriztük az eredeti PXDN szekvencia első 26 aminosavából álló peptidszakaszt. Ezek alapján az N-terminális szignál szekvencia jelenléte szükséges és egyben elégséges feltétele a PXDN hatékony szekréciójának.

A PXDN *in vitro* peroxidázaktivitásának szerkezetfüggését Amplex Red peroxidáz méréssel határoztuk meg a rekombináns konstruktokkal tranziensen transzfektált Cos7 sejtek lizátumából. A vad típusú PXDN a funkcióvesztéses mutánshoz és a negatív kontrollhoz képest jelentős enzimaktivitást mutatott, amit sem az oligomerizációt meggátló, 736. és 1315. ciszteineket érintő mutációk, sem a vWF C domén hiánya nem befolyásolt. Ezzel szemben a LRR és Ig C2 doméneket nem tartalmazó PXDN konstrukt nem rendelkezett mérhető peroxidázaktivitással. Ennek

hátterében feltételezéseink szerint a drasztikus N-terminális trunkálással létrehozott fehérje hibás foldingja állhat.

Ezt követően a PXDN és egyetlen ismert fiziológias szubsztrátja, a kollagén IV közötti interakció szerkezeti feltételeit tanulmányoztuk. Ehhez hasznos eszköznek bizonyultak a PXDN-deficiens MEF sejtek, amelyeket funkciómentő („rescue”) kísérletekhez használtunk fel. Ezek során vad típusú és mutáns PXDN konstruktokat juttattunk vissza a sejtekbe, majd azt vizsgáltuk, hogy azok milyen mértékben képesek a hiányzó kollagén IV keresztükötési működés helyreállítására. A kollagénázzal emésztett sejtenyészetek Western blot vizsgálata azt igazolta, hogy a vad típusú és a vWF C domén nélküli konstruktok hatékonyan katalizálták az NC1 domének összekapcsolását, a peroxidázaktivitás-hiányos PXDN mutáns azonban nem volt képes az NC1 dimerek közötti kovalens kötés létrehozására. A monomer C736S, C1315S konstrukt ugyan megtartotta NC1 keresztükötő képességét, de a vad típusú fehérjéhez képest jelentősen kisebb mennyiségű NC1 dimer kialakulását katalizálta.

A vad típusú és a monomer PXDN mutáns kollagén IV keresztükötési vizsgálatban tapasztalt eltérő hatékonyságának okát a konstruktok szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatával kívántuk felderíteni. A tranziensen transzfektált Cos7 sejtek permeabilizált mintáiban minden vizsgált PXDN forma esetében erős endoplazmás retikulum festődést figyeltünk meg, emellett azonban a vad típusú, peroxidázaktivitás nélküli és a vWF C doménelécióos 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 lefutása mentén elhelyezkedő, pontszerű képletekhez köthető festődés nem permeabilizált mintákban is megmaradt, ami alátámasztotta azok sejten kívüli elhelyezkedését. A monomer PXDN konstruktot expresszáló Cos7 sejtek nem permeabilizált mintáiban nem tudtunk PXDN-specifikus jelet detektálni. A vad típusú és monomer PXDN konstrukt eltérő lokalizációját más rendszerben is meg kívántuk erősíteni, ezért azokat PXDN-hiányos MEF sejtekben is kifejeztük, amelyekben a Cos7 sejtek esetében látottnak megfelelő festődési mintázatot tapasztaltunk.

Eredményeink alapján egy összefoglaló modellt alkottunk meg a PXDN oligomerizációs mechanizmusával és kollagén IV keresztükötő működésével

kapcsolatban. Eszerint a PXDN az endoplazmás retikulum lumenében humán szekvencia 736. és 1315. pozícióját elfoglaló cisztein reziduumaik keresztül diszulfidhidakkal stabilizált homotrimer formát alakít ki, majd az extracelluláris térbe történő szekréciónak követően sejtfelszíni adherens struktúrákba rendeződik. Feltételezésünk szerint ezek a korábban nem ismert képletek jelenthetik a kollagén IV keresztkötés fiziológiás helyét, ami magyarázatul szolgálhat a sejtfelszíni adhéziót nem mutató monomer PXDN forma vad típusú fehérjéhez képest mutatott alacsonyabb keresztkötési hatékonyságára.

Dolgozatom utolsó részében a PXDN homológjának, a PXDNL fehérjének szekvenciaelemzése és a rekombináns forma lokalizációjának vizsgálata során nyert eredményeinket ismertetem. Kollégám, Dr. Péterfi Zsolt doktori értekezésében bemutatta, hogy a PXDNL nem redukáló körülmények között a PXDN-hez hasonló, magas molekulatömegű komplexek kialakításában vesz részt, ami a PXDNL esetleges oligomerizációjára utalhat. A két fehérje közötti szekvenciaillesztéssel igazoltuk, hogy a PXDN esetében a trimerizáció szempontjából esszenciálisnak bizonyult 736. és 1315. ciszteinek megfelelői a PXDNL 722. és 1298. pozícióiban is megőrződtek, és a környező aminosavrégiók is nagymértékben konzerváltak a két homológban. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a PXDNL a PXDN-hez hasonló módon, az említett ciszteinek közötti diszulfidhidak segítségével alakíthat ki homotrimert szerkezetet.

Az PXDNL a PXDN-nel szemben ugyan nem rendelkezik enzimaktivitással, de a mátrixfehérjékre jellemző doménjei az ECM-ben adhezív funkciók ellátására teszik alkalmassá a fehérjét. A fehérje sejtfelszíni adhézióját a rekombináns PXDNL-V5-öt kifejező Cos7 sejtek immunfestésével vizsgáltuk. A sejten kívüli és belüli jelölődések elkülönítése érdekében az antitestek adását megelőzően detergens oldattal kezelt és anélkül processzált mintákat hasonlítottunk össze. A rekombináns konstruktot kifejező sejtek permeabilizált mintáiban kettős, az endoplazmás retikulum mellett a sejtmembrán mentén pontszerűen megjelenő PXDNL festődést észleltünk, amelyek közül permeabilizálás hiányában csak az utóbbit tudtuk detektálni.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az endogén PXDN enzimaktivitása primer emlős sejtekben is esszenciális a bazális membránokat alkotó kollagén IV protomerek NC1 doménjeinek kovalens 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 szekréciónak 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 sejtfelszíni 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 fiziológiás helyét a sejtmembránhoz asszociált PXDN-tartalmú “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.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### *A tézisek alapját képező közlemények*

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