

Az Ncb5or flavohem reduktáz sejten belüli lokalizációjának és egyes humán mutációinak vizsgálata

Doktori tézisek

Zámbó Veronika

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Csala Miklós, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Kereszturi Éva, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Töröcsik Beáta, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Horváth V. Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Komorowicz Erzsébet, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Jemnitz Katalin, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2017

Bevezetés

Az endoplazmás retikulum (ER) az intracelluláris homeosztázisban kiemelkedő jelentőségű, valódi metabolikus kompartmentként a külső és belső környezet változásaira érzékenyen reagálva, hatékonyan modulálja a sejt egészének működését. Az ER-membrán szelektív permeabilitásának köszönhetően a lumenben a citoplazmától karakterisztikusan különböző belső milió alakul ki, amelyet a redox rendszerek eltérő státusza és kapcsolatai, valamint több nagyságrenddel magasabb kalciumkoncentráció jellemez. Az ER sejten belüli tápanyagszenzorként működik, és e funkciójában redox rendszerei kiemelt szerephez jutnak. A lumen tiol-oxidáló környezete mellett a kompartmentben zajló enzimatikus folyamatok számára a redukált állapotú piridin-dinukleotid-készlet is elengedhetetlen, amelyet az organellum saját enzimaktivitásai tartanak fenn. A magas [NADPH]:[NADP⁺] arányt a H6PD és a G6PT együttműködése biztosítja. A képződő NADPH-t pedig a kortizoltermelő 11 β HSD1 használja fel a glukokortikoid célszervekben.

Munkacsoportunk számos új megfigyeléssel járult hozzá a G6PT-H6PD-11 β HSD1 triád fiziológias és patológias szerepének megismeréséhez. A hosszan fennálló tápanyag-túlkínálat, a G6P és F6P megnövekvő mennyiségén keresztül a luminális NADPH-szint emelésével a kortizol fokozott prepreceptorális aktiválódásához vezet, ami közrejátszik a metabolikus szindróma és diabétesz kialakulásában. Az elhízással összefüggő anyagcsere-betegségek patomechanizmusában azonban szerepet játszik a telített zsírsavak (lipo)toxikus hatása is. Egyre inkább nagy figyelem irányul azokra az endogén mechanizmusokra, amelyek képesek lehetnek a metabolizálandó zsíracil-KoA túlkínálatának csökkentésére. A telítetlen zsírsavak szintézisének első lépését az ER membránjában elhelyezkedő sztearoil-KoA-deszaturáz-1 (SCD1) enzim végzi, ami a kiegyensúlyozott telített/telítetlen zsíracil-KoA-kínálat fenntartásával járul hozzá a komplex lipidek szintéziséhez. A humán és állati sejtekben a zsíracil-KoA-deszaturázok egy elektrontranszfer-lánc terminális tagjaként a citokróm b₅-reduktáz flavoprotein (b5R) és a citokróm b₅ hemoprotein (b5) közvetítésével kapják a citoszolikus NAD(P)H-től származó elektronokat.

A nemrégiben felfedezett NAD(P)H citokróm-b₅-oxidoreduktáz (Ncb5or)

flavohemoprotein azért került érdeklődésünk középpontjába, mert szolúbilis mikroszomális oxidoreduktázként az ER-lumen redox homeosztázisának lehetséges új kapcsolatait vetette fel. A természetes fúziós fehérje a mikroszomális citokróm b₅ és citokróm b₅-reduktáz proteinekkal homológ doméneket tartalmaz, ezért feltételezhető, hogy közreműködik a zsírsav-deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszferben. A fehérje fiziológiás és patológiás szerepére egyaránt rávilágít, hogy knock-out állatmodelljében lipoatrófia mutatkozik, és az egerekben a β -sejtek fokozott zsírsavérzékenysége és progresszív pusztulásuk következtében diabetes mellitus alakul ki.

Az Ncb5or-t az ER-ben lokalizálódó, szolúbilis oxidoreduktázként írták le, ezért rendkívül fontosnak tartottuk, hogy a luminális redox homeosztázissal való esetleges kapcsolatait feltárjuk. Az Ncb5or citoplazmai elhelyezkedése esetén az enzim ugyanazzal a redox rendszerrel van kapcsolatban, amely a b5R és b5 enzimek közvetítésével amúgy is táplálja a zsírsav-deszaturációt, míg ha az Ncb5or képes a zsírsav-deszaturáció számára hozzáférhetővé tenni a luminális NADPH-t, ezzel közvetlen kapcsolatot teremtene a célsejtekben a celluláris lipid-metabolizmus és a prereceptorális hormonaktiválás között, ami a sejtorganelum nutriensszensor funkciójának új mechanizmusát is jelentené. Az enzim sejten belüli elhelyezkedésére vonatkozó adatok azonban máig ellentmondásosak.

A knockout állatmodell fenotípusa alapján továbbá felmerül, hogy olyan mutációk, amelyek az Ncb5or fehérje funkcióképtelen vagy csökkent aktivitású változatait eredményezik, humán diabéteszben is kóroki jelentőséggel bírhatnak. Az *NCB5OR*-mutációk és a diabétesz kapcsolatáról nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Egy humán genetikai analízisben minor korrelációt mutattak ki az *NCB5OR* gén polimorfizmusa és a 2-es típusú diabétesz között. A vizsgált variánsok közül csupán egy esetében írtak le szignifikáns asszociációt 2-es típusú diabéteszrel eset-kontroll analízis során. A vizsgálatban két kivétellel intronikus variánsok szerepeltek, melyek tehát nem járulnak hozzá jelentős mértékben a betegség patogeneziséhez, azonban további mutációk, különösen az exonban helyet foglalók vizsgálata értékes adatokkal szolgálhat.

Célkitűzések

Az újonnan felfedezett természetes fúziós fehérje biológiai szerepe kapcsán számos kérdés még megválaszolatlan. Mindenekelőtt tisztázásra szorul a flavohem reduktáz enzim intracelluláris lokalizációja. Alapvető jelentőséggel bír annak tisztázása, hogy a mikroszomálisként emlegetett fehérje az ER-membrán melyik oldalán található. ER-beli elhelyezkedése felveti azt a lehetőséget, hogy a zsírsav-deszaturáció luminális NADPH-t fogyaszthat, vagyis összeköttetésben állhat a prereceptorális kortizoltermeléssel is.

Az *Ncb5or*-hiányos egerekben megfigyelt β -sejtpusztulás és diabétesz megalapozza azt a feltételezést, hogy a humán *NCB5OR* gén egyes mutációinak szintén szerepe lehet a diabétesz kialakulásában. Az *Ncb5or* fehérje hiánya és a diabétesz kialakulása között állatmodellben egyértelműen kimutatott összefüggés ellenére a humán génvariánsok – különösen az exonikus mutációk – lehetséges szerepéről rendkívül kevés adat áll rendelkezésre az irodalomban.

Munkánk során tehát célul tűztük ki:

- Az *Ncb5or* fehérje intracelluláris lokalizációjának tisztázását.
- Természetes humán *NCB5OR* misszensz mutációk hatásának vizsgálatát *in vitro* sejtes rendszerben.

Módszerek

A humán *NCB5OR* gén természetes, misszensz mutációinak *in silico* keresését az NCBI SNP és az 1000 Genom adatbázisokból végeztük. Az egyes mutációk fehérjeszerkezetre gyakorolt hatását az I-TASSER fehérjeszerkezet-jósló program segítségével vizsgáltuk. A fehérje szubcelluláris lokalizációját hat különböző, fehérjeszekvencia alapú predikciós program segítségével elemeztük.

Az Ncb5or, illetve az Ncb5or-GFP fluoreszcens fúziós fehérje termeléséhez az enzim kódoló szekvenciáját pcDNA3.1 és p.EGFP-N1 expresszós vektorba inszertáltuk és ligáltuk. Az Ncb5or misszensz mutációt tartalmazó variánsait kifejező konstrukciókat a vad típusú expressziós vektorból kiindulva, ún. „overlap extension” mutagenézissel hoztuk létre. A vad típus, valamint a p.E87G és a p.E93G variánsok esetében ugyanezen módszerrel elkészítettük a Glu-Glu epitóp címkével ellátott változatokat is. A transzfekciókat humán eredetű HEK293T és HepG2 sejteken végeztük. Az Ncb5or vad típus és egyes génvariánsainak mRNS-expresszióját RT-PCR és qPCR módszerével egyaránt vizsgáltuk. Belső kontrollként a *GAPDH* génjét alkalmaztuk mindkét esetben.

A sejtizátumok fehérjéit SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd PVDF membránra blottoltuk. A membránok blokkolását követően az elsődleges antitesteket egy éjszakán át, a HRP-konjugált másodlagos antitesteket 1 órán át alkalmaztuk. A detektálást kemilumineszcens technikával végeztük. A specifikus csíkokat denzitometriával, β -aktinra normalizálva értékeltük ki ImageQuant 5.2 program segítségével.

A HEK293T és HepG2 sejtekből Dounce homogenizátorral, illetve patkány májszövetből Potter-Elvehjem készülék segítségével nyert homogenizátumokat többlépéses differenciál-centrifugálással választottuk különálló frakciókra. Az első centrifugálás (1000 x g, 10 perc, 4 °C) során ülepedett ki a sejtmagi frakció. A felülúszó újabb centrifugálásakor (11 000 x g, 20 perc, 4 °C) a mitokondriális fázis került a pelletbe. Utolsó lépésben a „posztmitokondriális” felülúszót ultracentrifugáltuk (100 000 x g, 60 perc, 4 °C), így elválasztva a kiülepedő mikroszomális frakciót a felülúszóként megmaradt citoszolikus frakciótól. Az így

előállított, pelletbe került sejtfrakciókat egyaránt PBS-ben szuszpendáltuk. A sejt- és szövetfrakciók tisztaságát immunoblottal ellenőriztük.

Az intakt patkány mikroszóma endogén redukált piridin-dinukleotid szintjének változását fluorimetriával detektáltuk. A sztearoil-KoA-t e kísérletekben a membránpermeabilizáló hatás elkerülése céljából 100 μM -nál kisebb (10 és 50 μM) koncentrációban használtuk.

A vad típusú és a p.E87G mutációt tartalmazó Ncb5or fehérjék intracelluláris degradációjának nyomon követésére az ún. „pulse-chase” jelölést alkalmaztuk 100 μCi ^{35}S -Tran-jelölt [^{35}S] metioninnal és [^{35}S] ciszteinnel. Jelöletlen metionint és ciszteint tartalmazó médiumcserét követően a sejtek lízisét különböző időpontokban (0, 1, 3 és 22 óra elteltével) végeztük. A radioaktívan jelölt vad típusú és p.E87G Ncb5or fehérjéket immunprecipitációval és Protein-A sepharose gyöngyök segítségével kötöttük ki a teljes sejtlizátumból. A fehérjék szeparálását követően a szárított gélt foszfo-screen segítségével exponáltuk.

Az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje intracelluláris expresszióját a sejtmag (DAPI) és az ER (BODIPYTM TR-X thapsigargin) jelölése mellett vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóppal. Az endogén Ncb5or szubcelluláris elhelyezkedésének immuncitokémiai vizsgálatához HepG2 sejteket tárgylemezre növesztettük. Fixálásukat követően kettős jelölésként az Ncb5or elleni monoklonális egér, majd Alexa Fluor 488 anti-egér és a PDI elleni poliklonális nyúl, majd Alexa Fluor 568 anti-nyúl ellenanyagokat használtuk a vizsgált fehérje és az ER egyidejű megjelenítésére.

Az adatok statisztikai elemzését a Tukey-Kramer féle többszörös összehasonlítási teszttel végeztük GraphPad InStat program segítségével. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha a p értéke kisebb volt, mint 0,01, illetve 0,001.

Eredmények

Az Ncb5or szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata

Munkánk első része az Ncb5or fehérje sejten belüli lokalizációjának meghatározására irányult. Az *in silico* vizsgálatok ER-retenciós szignál és egyéb irányító szekvenciák hiányában citoszolikus lokalizációt valószínűsítettek. Ezt kísérletesen többféleképpen is igazoltuk:

- Az endogén Ncb5or fehérje sejten belüli elhelyezkedését két sejtvonalon (HEK293T és HepG2), valamint patkány májszöveten is vizsgáltuk. A mintákból differenciál-centrifugálással sejt- és szövetfrakciókat készítettünk, melyek fehérje tartalmát immunoblottal vizsgáltuk. **Az Ncb5or-t kizárólag a citoplazmatikus frakcióban detektáltuk.**
- Elkészítettük az Ncb5or-EGFP fúziós fehérje eukarióta expresszióra alkalmas vektorkonstrukcióját, majd az ezzel transzfektált sejtekben a fehérje *in situ* lokalizációját fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A fúziós fehérje a tranziensen transzfektált sejtekben hatékonyan expresszáldott és a translálódott Ncb5or-EGFP polipeptid megőrizte stabilitását. A mikroszkópos felvételek alapján a fúziós fehérje diffúzan töltötte ki a sejtek citoplazmáját és nem mutatott ko-lokalizációt sem a sejtmag, sem az ER jelölésével. **Az exogén, fúziós fehérjeként expresszált Ncb5or fehérje sejten belüli eloszlása tehát szintén a citoszolikus elhelyezkedést támasztja alá.**
- **Az endogén, natív fehérje citoszolikus elhelyezkedését immuncitokémiai módszerrel is alátámasztottuk.** Az Ncb5or-specifikus jelölés egyértelműen a citoplazmában elszórtan volt látható. Nomarski DIC módszert alkalmazva jól látszott, hogy a fluoreszcens szignál a sejthatárokon belül, a sejt nyúlványait is kirajzolva, egyenletesen oszlik el, és nem mutat ko-lokalizációt az ER jelölésével.

- A sztearyl-KoA lúminális piridin-dinukleotid redox állapotára gyakorolt esetleges hatását patkány máj mikroszómápreparátumon vizsgáltuk. Azt kaptuk, hogy **a lúminális NAD(P)H-szint nem változott a mikroszómális sztearyl-KoA-deszaturáz (SCD1) külsőleg hozzáadott szubsztrátja, sztearyl-KoA hatására.**

A humán Ncb5or természetes variánsainak molekuláris biológiai vizsgálata

A humán *NCB5OR* gén aminosavkicserélődést okozó természetes mutációinak az enzim fehérje expressziójára gyakorolt hatását tanulmányoztuk:

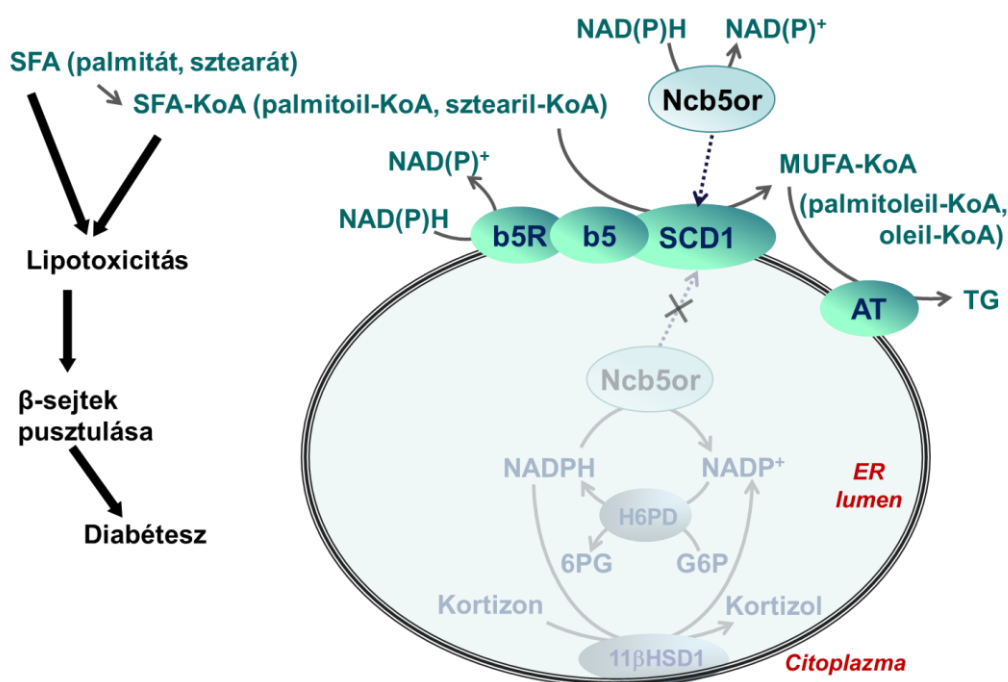
- Vizsgálataink során az NCBI SNP és 1000 Genom adatbázisok segítségével öt aminosavcserét okozó *NCB5OR*-génvariánst (p.E87G, p.E93G, p.E118A, p.R140H, p.N249S) választottunk ki. Ezek expresszióját a vad típusal összehasonlítva két esetben olyan különbségeket észleltünk a fehérjemennyiségekben, amelyek az mRNS-szintek eltéréseivel nem voltak megmagyarázhatók. **A p.E87G variáns fehérjemennyisége csupán tizede, a p.E93G variánsé pedig mintegy ötöde volt a vad típusú Ncb5or fehérjének.** Ezt a megfigyelést Glu-Glu epitóp taggal ellátott konstrukciók segítségével, valamint két különböző sejtvonalon (HEK293T, HepG2) elvégzett kísérletekkel is sikerült megerősítenünk.
- A p.E87G és p.E93G mutációkat tovább vizsgálva E/Q mutánsokat is létrehoztunk, melyekkel a megváltozó oldallánc méretének és/vagy töltésének szerepét kívántuk tisztázni. Az Ncb5or fehérje intracelluláris mennyiségét az E/Q mutációk csökkentették ugyan, ez a változás azonban jelentősen elmaradt a természetes Glu-Gly variánsoknál észleltektől. Az eredmény azt mutatja, hogy **a töltés elvesztése, bár csökkenti a sejten belül detektálható fehérje mennyiségét, önmagában nem felelős az Ncb5or fehérjeszint természetes mutánsoknál észlelt markáns csökkenéséért.**

- A vad típusú, a p.E87G és a p.E93G Ncb5or fehérjék intracelluláris degradációjának mértékét a transzláció gátlásával, valamint a fehérje féléletidejének meghatározásával követtük nyomon. A vad típusú Ncb5or fehérje mennyisége lassan csökken, a négyórás cikloheximidkezelés végére a kezdeti fehérjeszint mintegy 70%-a detektálható. Ezzel ellentétben a p.E87G és p.E93G Ncb5or-variáns fehérjéknek csupán 10%-a, illetve 20%-a maradt kimutatható. **Megállapítottuk, hogy a két, Glu-Gly aminosavcserét eredményező mutáció hatására az Ncb5or fehérjék sejten belüli lebontása fokozódott. A p.E87G mutációt hordozó fehérje féléletideje valóban közel tizede (1,5 óra) volt a vad típusú Ncb5or-nek (14,2 óra).**
- A p.E87G és p.E93G variánsok esetében észlelt nagymértékű fehérjeszint-csökkenés kivédhető volt proteaszómagátlókkal, ami a mutánsok felgyorsult proteaszomális degradációjára utal.
- A mesterségesen létrehozott kettős mutáns (p.E87G_p.E93G) Ncb5or fehérje mennyisége az egyszeres mutánsokénál is alacsonyabb, mindössze a vad típusú 7%-a volt, és a két aminosavcserét együtt tartalmazó fehérje degradációja az egyszeres mutációkat tartalmazóknál intenzívebbnek bizonyult, vagyis **a két mutáció egymás hatását erősítette.** Míg a proteaszómagátló laktaciszтин teljes mértékben megakadályozta a kettős mutáns proteaszomális degradációját, addig az MG132 az alkalmazott koncentráció mellett csak részlegesen védte ki a fehérje fokozott degradációját.

Következtetések

Munkánk során egyrészt a humán Ncb5or fehérje szubcelluláris lokalizációját kívántuk tisztázni, másrészt megvizsgáltuk a humán *NCB5OR* gén ismert, exonikus misszensz mutációit abból a szempontból, hogy okoznak-e olyan fehérjeszint-csökkenést, ami esetleg kapcsolatba hozható a diabétesz kialakulásával. Eredményeink alapján az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Az Ncb5or fehérje nem tartalmaz olyan ismert célba juttató “targeting” szignálokat, amelyek az enzimet az ER-be irányítanák, illetve az ER-ben tartanák. A fehérje – akár endogen, akár exogén termelődésű – különböző vizsgálati módszerekkel a citoszólban volt kimutatható, és nem mutatott kolokalizációt az ER markerfehérjével. Az Ncb5or tehát citoplazmatikus enzim, amely nem áll szoros és tartós kapcsolatban az ER-rel.

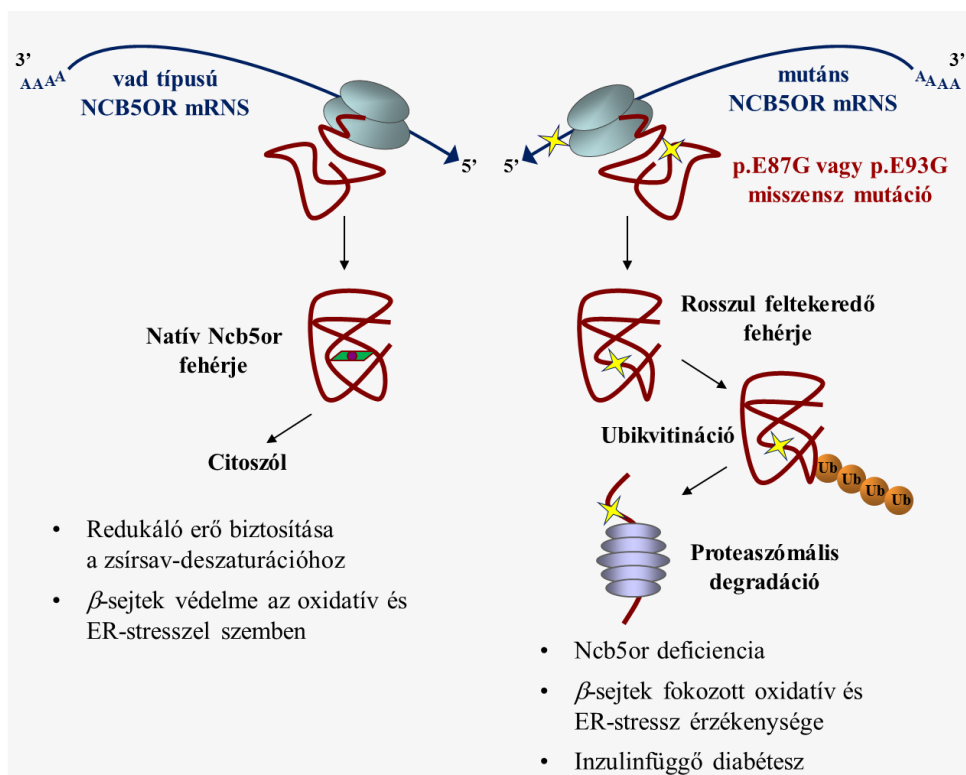


1. ábra. Az Ncb5or fehérje a citoszól felől szolgálhat alternatív elektronforrásként az SCD1 számára

2. A máj mikroszómához adott sztearoil-KoA nem befolyásolta az elektronforrásként rendelkezésre álló intravezikuláris NAD(P)H mennyiségét, ami az Ncb5or kimutatott lokalizációjával összhangban azt mutatja, hogy az ER citoplazmai felszínén működő SCD enzim aktivitása

nincs közvetlen összefüggésben a luminális piridin-dinukleotidok redox rendszerével. Az Ncb5or tehát nem létesít funkcionális összeköttetést a zsírsav-deszaturáció és a prereceptorális kortizolaktiválás között.

3. A humán *NCB5OR* p.E87G és p.E93G aminosavcserét okozó természetes misszensz mutációi a fehérje mennyiségének jelentős csökkenését eredményezik a vizsgált human sejtvonalakban. A “knockout” egér fenotípusának ismeretében ez felveti a két humán mutáció diabétesz kialakulásában betöltött szerepének lehetőségét.
4. A humán Ncb5or p.E87G és p.E93G aminosavcseréi markánsan és szinergisztikusan rövidítik a mutáns fehérjevariánsok intracelluláris féléletidejét. Mindkét mutáció fehérjeszint-redukáló effektusa hatékonyan kivédhető proteaszómagátlókkal. A két vizsgált mutáció tehát azáltal csökkenti az Ncb5or enzim mennyiségét, hogy gyorsítja a fehérje proteaszómális lebontását, és ez valószínűleg a polipeptid destabilizálásának következménye.



2. ábra. Az Ncb5or fehérje féléletidejét rövidítő misszensz mutációk feltételezett *in vivo* következményei

5. A természetes p.E87G és p.E93G, valamint mesterséges p.E87Q és p.E93Q mutációk vizsgálata azt mutatta, hogy a két evolúciósan konzervált glutamát egység negatív töltésének, illetve hidrophil oldalláncának megléte egyaránt szükséges az Ncb5or stabilitásához, vagyis hosszú féléletidejének fenntartásához. Korrelációt találtunk a fehérje b5-szerű doménjében számított térszerkezeti változás és a fehérjeszint-csökkenés mértéke között. Az Ncb5or 87-es és 93-as glutamát oldalláncait érintő misszensz mutációk fehérjedestabilizáló hatásában tehát szerepet játszhat a b5-szerű domén hemkötő régiójának torzulása.

Az új oxidoreduktázzal kapcsolatban tett megfigyeléseink választ adnak a célkitűzések során feltett kérdéseinkre, ugyanakkor újabbakat is felvetnek. További kutatásnak kell tisztáznia, miért van szükség a zsírsav-deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszfer alternatív útvonalára, ha az ugyanazt a celluláris NAD(P)H-készletet használja, mint a már meglévő komponensek. Vizsgálni kell, milyen hatások váltják ki, illetve fokozzák az Ncb5or részvételét a deszaturációban, valamint, hogy milyen egyéb redox folyamatokban közreműködhet. Érdemes továbbá annak is utána járni, hogy egyes mutációk, hogyan befolyásolják a fehérje különleges hemkötő régiójának szerkezetét, és hogy a prosztetikus csoport iránti affinitás esetleges változása mekkora szerepet játszik a polipeptidlánc gyorsult degradációjában.

Rövidítések:

11 β HSD1: 1-es típusú 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz, **G6PD**: glukóz-6-foszfát-dehidrogenáz, **G6PT**: glukóz-6-foszfát-transzporter, **H6PD**: hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz, **GAPDH**: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, **DAPI**: 4,6-diamidin-2-fenilindol, **SDS-PAGE**: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis, **GFP**: zöld fluoreszcens fehérje, **Gln/Q**: glutamin, **Glu/E**: glutamát, **Gly/G**: glicin, **DIC**: Nomarski differenciál interferencia kontraszt

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

1. Kalman FS, Lizak B, Nagy SK, Meszaros T, **Zambo V**, Mandl J, Csala M, Kereszturi E. (2013) Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. Biochimie, 95(7):1403-1410. IF: 3,123
2. **Zambo V**, Toth M, Schlachter K, Szelenyi P, Sarnyai F, Lotz G, Csala M, Kereszturi E. (2016) Cytosolic localization of NADH cytochrome b(5) oxidoreductase (Ncb5or). FEBS Lett, 590(5):661-671. IF: 3,623

A dolgozat témájától független publikációk jegyzéke:

1. **Zambo V**, Simon-Szabo L, Szelenyi P, Kereszturi E, Banhegyi G, Csala M. (2013) Lipotoxicity in the liver. World J Hepatol, 5(10):550-557.
2. Polgar N, Csongei V, Szabo M, **Zambo V**, Melegh BI, Sumegi K, Nagy G, Tulassay Z, Melegh B. (2012) Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. Int J Immunogenet, 39(3):247-252. IF: 1,355