

A Nox4 NADPH oxidáz működésének vizsgálata

Zana Melinda

Doktori tézisek

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Geiszt Miklós D.Sc., az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Benkő Szilvia, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Kardon Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sarkadi Balázs, D.Sc., egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Cervenák László Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Nagy Péter D.Sc., az MTA doktora, tudományos osztályvezető

Budapest

2019

Bevezetés

A reaktív oxigén származékok (ROS) szervezetben betöltött szerepe napjainkban is intenzíven kutatott terület. Kezdetben pathofiziológiás folyamatokhoz kötötték őket, de ez a kép az elmúlt néhány évtized alatt erőteljesen átformálódott. Mára bizonyított, hogy a szabályzott ROS termelés számos területen esszenciális komponense a szervezet egészséges homeosztázisának, mint például az immunvédelem, a hormonszintézis, az oxigénérzékelés vagy a vazoreguláció.

A szabályzott ROS termelésért többsejtű organellekben a NADPH-oxidáz (Nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát oxidáz) enzimek felelősek, közös jellemzőjük egy konzervált, transzmembrán katalitikus doménon keresztüli elektrontranszfer, ahol elektron donorként NADPH-t, akceptorként molekuláris oxigént használnak, amely a reakció során szuperoxid anionná, vagy hidrogén-peroxiddá alakul át.

A család legmegosztóbb tagját, a Nox4-et teljes hosszúságában Geiszt Miklós és munkatársai 2000-ben klónozták meg. A humán gén a 11. kromoszóma hosszú karján található, 18 exont tartalmaz. Az átíródó teljes, aktivált fehérje 578 aminosavból áll, 66.5 kDa tömegű, aminosav sorrendje 57%-os homológiát és 39%-os egyezést mutat a Nox2 enzimmel. A nagyfokú homológia ellenére a Nox4 a NADPH oxidáz család egyik alcsoportjába sem illik be igazán.

A Nox4 is $p22^{\text{phox}}$ -dependens, de egyedülálló azon tulajdonságában, hogy a többi $p22^{\text{phox}}$ -függő oxidáz (Nox1 Nox2 és Nox3) mellett nem bizonyított, hogy igényelne más kofaktorokat, citoszólikus regulátorokat, melyek esszenciálisak a Nox4 közvetlen aktivációjához. Ezt a megállapítást megerősíti, hogy a $p22^{\text{phox}}$ fehérje C-terminális trunkálásával azon motívumok elrontása, mely a Nox1 Nox2, és Nox3 esetén gátolta a ROS termelést, nincs hatással a Nox4 aktivációjára.

A Nox4 által termelődő ROS két lépésben, szuperoxid közti termék képződése mellett 90%-ban H_2O_2 , mint az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációra aktiválódó Nox5, Duox1 és Duox2. Aktivációt követően a Nox4 dehidrogenáz doménje intrinsic aktivált konformációban marad, a NADPH-ról folyamatos az elektrontranszfer FAD-ra, majd a hem csoportokra, így az aktív Nox4 enzim konstitutív módon H_2O_2 -ot termel.

Szöveti expressziós mintázata *in situ* hibridizációs kísérletek, RNS seq adatok alapján a Nox4 mRNS-e legnagyobb mennyiségben a vesében található, de jelen van más szövetekben is. Sejtszintű expressziója is széleskörű eloszlást mutat, leírták adventitiális-, tüdő-, és bőr eredetű fibroblasztokban, ér endothél sejtekben, adipocitákban, hepatocitákban, oszteoklasztokban is.

A Nox4 pontos szubcelluláris lokalizációját illetően nincs egységes álláspont. Szerkezetét tekintve nem található rajta semmilyen szignál- vagy ER retenciós szekvencia, mégis a legtöbb esetben az ER és a mitokondrium membránjában detektálták.

Egyelőre nyitott kérdés, hogy milyen funkciót tölthet be, egy a legnagyobb mennyiségben a vesében expresszálódó oxidáz, mely konstitutív enzimaktivitásával szignalizációs hírvivő molekulát, H_2O_2 -ot generál. A vesében, tüdőben talán oxigén szenzor lehet. A Nox4 oxigénkötési katalitikus állandója abban a tartományban van, amely már az ismert oxigén szenzorokra jellemző, valamint a jelátvitelben semlegesnek tekinthető oxigén molekula tenzióját képes redox jellé konvertálni. A H_2O_2 által közvetített szignalizációs jel a sejt redox állapotának jelzőrendszere, amely kinázok és foszfatázok redox szabályozásán keresztül módosíthatja a sejt foszfo-szabályzott útvonalait, így összegezve a különféle aktivációs csatornákon érkező eltérő ingereket. Kardiovaszkuláris szövetekben proliferációt indukál, hasnyálmirigy-, májsejtekben túlélési szignálokat közvetít. A Nox4 fokozott aktivitása, és az általa generált ROS oxidatív stresszt okoz, mely redox-függő transzkripció

faktorokat aktivál, mint NF χ B, Keap1, Bach2, ami pedig onkogenezist vagy sejthalált inicializálhat.

Farmakológiai szempontból is jelentős és intenzíven kutatott terület a Nox4 szerepe a szövetekben kialakuló fibrotikus elváltozások során. A fiziológias sebgyógyulás során a szöveti fibroblasztok Nox4-függő módon H₂O₂-ot termelnek a miofibroblaszttá differenciálódás alatt. A termelődő ROS a differenciáció hatékonyságát növeli, feed-forward szabályozást tart fenn, valamint fokozza az extracelluláris mátrix fehérjék, például fibronectin és proteoglikánok, α -simaizom aktin szintézisét. Aktiválja a MAPK kaszkádot és további kináz útvonalakat, melyek szintén a differenciációt, sejtproliferációt erősítik.

A Nox4 funkciójának, pontos lokalizációjának és működési mechanizmusának megértése akár új lehetőséget teremtene egy célmolekulára, amely inhibíciójával specifikusan csökkenthető, talán gátolható lenne a vese-, vagy tüdőfibrózis lefolyása.

Célkitűzések

Doktori munkám során több egymással szorosan összefüggő kérdéskört vizsgáltam az alábbi főbb célokra fókuszálva:

1. A PreFRET genetikailag kódolt intracelluláris H_2O_2 szint érzékelő sonda működési elvének jellemzése mutációanalízissel.
2. Primer humán pulmonáris és dermális fibroblaszt sejtek endogén Nox4 expressziójának és aktivációjának vizsgálata.
3. A Nox4 és $p22^{phox}$ kapcsolatának vizsgálata Nox4 KO és $p22^{phox}$ -deficiens egérmodellek segítségével.
4. Nox4 és $p22^{phox}$ szubcelluláris lokalizációjának feltérképezése és az aktivált komplex által termelődő H_2O_2 intracelluláris jelenlétének detektálása.

Módszerek

Plazmid konstrukciók: A humán Nox4 és p22^{phox} fehérjék tranziens transzfekciójához a fehérjék kódoló régióit pCDNA3.1 vektorba klónoztuk. A V5- és AU1-epitópokat irányított mutagenézissel, a rapamicin alapú indukciós rendszer CFP-FRB-HA szekvenciát tartalmazó partnerét restriktív enzimek és T4 ligáz segítségével illesztettük a vektorba, N-terminálisan a Nox4-hez és C-terminálisan a p22^{phox}-hoz.

Sejttenyészetek és transzfekció: A plazmidokat tranziens transzfekcióval expresszáltattuk a sejtekben. A fibroblasztokat elektroporáltuk Neon Transfection System segítségével, HeLa sejt vonalra pedig Lipofectamine LTX reagenssel jutattuk be vektorainkat. Farok fibroblaszt sejtek preparálásához 8 hetes korban farokvégből kollagenáz emésztéssel készítettük sejttenyészetet. A Nox4 komplex indukálásához konfluens tenyészeteken az alap tápoldatuk szérumszintjét 12 órára 0,05 %-ra csökkentettük, majd 5 ng/mL TGF- β 1-et adtunk rutinszerűen 24 óráig.

Western blot: A p22^{phox} és β -aktin fehérjék vizsgálatához a sejtek RIPA pufferes lizátumát SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A fehérjéket az elsődleges 16G7, és β -aktin ellenanyagokkal, majd tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel, ECL módszerrel detektáltuk.

QPCR: fibroblaszt sejtjeinkből Trifast reagenssel teljes RNS-t izoláltunk, majd cDNS-sé írtuk át oligo(dT)18 primer és M-MuLV reverz transzkriptáz segítségével. A QPCR reakciókat Roche LightCycler 1.5 készüléken futtattuk, a PCR-termékeket SYBR Green festékkel detektáltuk, majd a Cp értékeket 2. derivált módszerrel határoztuk meg. A relatív expressziós szinteket az indukálatlan, kontroll fibroblasztok azonos génjének mennyiségére, vagy a β -aktin háztartási génre normalizálva ábrázoltuk.

Extracelluláris H_2O_2 mérése Amplex Red módszerrel: A sejteket konfluens állapotban H-médiumban 50 μ M Amplex Red reagens és 0.1 U/mL HRP jelenlétében 37 °C-on inkubáltuk 60 percig, majd POLARStar OPTIMA fluoriméteren a rezorufin 30 perces inkubálást követő fluoreszcenciáját percenkénti leolvasással, 590nm-en detektáltuk.

Immunfluoreszcens jelölések és konfokális mikroszkópia: A V5- és AU1-el jelölt fehérjék lokalizációját tranziensen transzfektált fibroblasztok PFA-val fixált, permeabilizált mintáin vizsgáltuk. A V5- és 16G7 ellenanyaggal történő festődést másodlagos antitestekkel tettük láthatóvá. Felvételeinket Zeiss LSM510 típusú konfokális mikroszkóppal készítettünk 63-szoros nagyítású Plan-Apochromat Objektívvel. A képek 1-2 μ m optikai szeletvastagsággal, multitrack módban készültek. A képek készítésénél az emissziót a Cerulean esetén 420-480 nm-es szűk sávú filteren, a Venus, Alexa 488 és a HyPer1 esetén 500 és 530 nm-es, szintén szűk sávú, míg az Alexa 568 mérése során 560 nm felett széles sávon átengedő filteren engedjük át.

Intracelluláris H_2O_2 szintek detektálása HyPer1 szenzorral: Tranziensen transzfektált fibroblasztokban a HyPer1 szenzort szekvenciálisan gerjesztettük 490 és 420 nm-en, a kibocsátott fényt 505 nm-es dikroikus tükrön és egy 525/36 nm-es emissziós szűrőn engedjük át, valamint 520 nm-en mértük emissziós maximumát egy 40x objektívvel és Photometrics CascadeII kamerával ellátott fordított állású Zeiss Axio Observer mikroszkópon.

Rapamicin-alapú dimerképzés: Dermális fibroblaszt sejteket FRB-YFP és a CFP-FKBP12-p22^{phox} vagy CFP-FKBP12-Nox4 plazmidokkal kotranszfektáltuk, majd konfokális mikroszkópon kinetikai méréseket végeztünk 5-10 másodperces képkészítési frekvenciával 15 percig, miközben 3 percenél 300 nM-os rapamicint adtuk a sejtekhez.

Eredmények

Annak érdekében, hogy megértsük a PerFRET szonda működését, megvizsgáltuk mely ciszteinek felelősek a H_2O_2 -ra adott válaszáért, ezért elkészítettük az Orp1- és Yap1 cCRD doménekben előforduló összes cisztein aminosav szerinre cserélt változatát és fontosabb kombinációit tartalmazó szondákat. HeLa sejtekben a PerFRET szonda összes variánsa kifejeződött, citoszolikus lokalizációt mutatott. Az Orp1 36-os pozíciójú ciszteinjének mutálása önmagában elegendő volt a PerFRET teljes funkcióvesztéséhez. Az Orp1 C64S és C82S variánsai alapján a második és harmadik ciszteinek nem esszenciálisak. Az Orp1 36-os ciszteinje a Yap1 cCRD középső ciszteinjével (C620) lép interakcióba, a másik két Yap1 cCRD mutálása nem okozott zavart a H_2O_2 érzékelésben.

Primer humán dermális és pulmonáris fibroblasztokban vizsgáltuk, hogy megjelenik-e a sejtek extracelluláris terében TGF- β 1 kezelés hatására H_2O_2 . Ehhez szérum depléciót követően a fibroblasztokat 24 óráig TGF- β 1-gyel indukáltuk, majd Amplex Red módszerrel mértük a termelődő H_2O_2 szintjét kontroll és a mérés során DPI-vel gátolt vagy Nox4 specifikus siRNS-sel előkezelt sejtek mellett. A fibroblasztok extracelluláris terében a TGF- β 1 stimulus szignifikánsan növelte a H_2O_2 termelődést, mely gátolható volt DPI-vel és Nox4 elleni specifikus siRNS-sel.

Preparáltunk farokvég fibroblaszt sejteket 8 hetes, Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens, illetve vad típusú társaikból majd szérum depletáltuk a tenyészetet és 24 óráig TGF- β 1-gyel kezeltük. A sejtek által termelt H_2O_2 mennyiségét Amplex Red módszerrel mértük. A vad típusú egérekből izolált fibroblasztok esetén a TGF- β 1 kezelés indukálta a H_2O_2 termelést, mely Nox4 KO egerek fibroblasztjaiban elmaradt és szignifikánsan alacsonyabb volt a p22^{phox}-deficiens egérből származó fibroblasztok esetén. A p22^{phox}-deficiens egerekben

a gén Y121H aminosav cseréje instabil p22^{phox} fehérjét eredményez, mely a Nox4-gyel alkothat kis mennyiségű, de funkcionális komplexet.

Megvizsgáltuk, hogy a TGF- β 1 indukciónak van-e transzkripciós szinten hatása a p22^{phox} és Nox4 mRNS-ek mennyiségére. Szérum depléciót követően dermális és pulmonáris fibroblasztokat indukáltunk 24 órás TGF- β 1 kezeléssel, majd teljes RNS-t izoláltunk belőlük, cDNS-sé írtunk át, és QPCR reakcióban mértük a relatív expressziós szintjüket. A sejtvonalakban a Nox4 mRNS szintje TGF- β 1 kezelés hatására a nyugalmi állapothoz képest szignifikánsan emelkedett, ezzel ellentétben a p22^{phox} mRNS mennyiségét nem befolyásolta a TGF- β 1 kezelés. Ellenőriztük, hogy a humán primer fibroblasztok kifejeznek-e más Nox rendszereket is, amelyek lehetséges forrásai a H₂O₂ termelésnek. Ehhez QPCR reakcióban ellenőriztük a többi ismert NADPH oxidázt és aktivátorait, hogy TGF- β 1 indukciót követően és kontroll sejteken expresszálódnak-e. Tapasztalataink alapján ezen humán primer bőr-, és tüdő eredetű fibroblasztok nagy valószínűséggel nem rendelkeznek más NADPH oxidáz rendszerrel. A p22^{phox} mRNS-e indukciótól függetlenül is jelen van, de a Nox4 expressziója csak TGF- β 1 stimulust követően kimutatható.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a p22^{phox} fehérje mennyisége függ-e a Nox4 expressziójától vagy a TGF- β 1 indukciótól. Humán primer fibroblasztokat, a Nox4 KO, p22^{phox}-deficiens és vad típusú egértörzsekből izolált farokvég fibroblasztokat 24 óráig kezeltük TGF- β 1-gyel. Feltártuk a sejteket, Western Blot kísérletben detektáltuk a p22^{phox} fehérje mennyiségét. Változatlanak találtuk a p22^{phox} fehérje szintjét a TGF- β 1 kezeléstől függetlenül, valamint nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget vad típusú és a Nox4 KO egerekben sem.

Készítettünk V5- és AU1-epitóppal jelölt Nox4 és p22^{phox} fehérjéket expresszáló plazmidokat, melyeket dermális fibroblasztokban expresszáltattunk, majd intracelluláris elhelyezkedésüket immunfestéssel tettük láthatóvá. Az általunk készített konfokális mikroszkópos képek alapján a Nox4 és p22^{phox}

kolokalizálnak egymással és az ER markerként alkalmazott BiP fehérjével is. Emellett nem tapasztaltunk egyéb nukleáris, vagy mitokondriális festődést. A TGF- β 1 kezelés által indukált miofibroblaszt differenciáció sem befolyásolta a komplex szubcelluláris lokalizációját.

A HyPer1 szenzort dermális fibroblasztokban a főbb sejtalkotókba irányítottuk, hogy feltérképezzük intracelluláris sejtalkotói oxidáltságát a TGF- β 1 kezelést megelőzően, illetve a miofibroblaszt differenciáció során. A kontroll és TGF- β 1 indukált sejtekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget egyik sejtalkotó oxidáltságában sem, viszont a sejtek ER lumenében expresszált HyPer1 már maximálisan oxidált formában van, így itt csak csökkenést tudunk volna detektálni, de szintjét változatlanak találtuk.

Építettünk egy rapamicin-alapú indukciós rendszert, ahol az FKBP12 fehérje az mTOR kináz rapamicin-kötő doménjével, az FRB-vel rapamicin jelenlétében gyors transzlokációval heterodimert képez.

A dimerpár FRB tagját a Nox4 N-terminális, illetve a p22^{phox} C-terminális végéhez illesztettük, majd dermális fibroblasztokban a hozzájuk kapcsolt fluoreszcens fehérjék segítségével konfokális mikroszkóppal követtük a dimerpár citoszólikus tagjának mozgását. A YPF-FKBP12 fúziós fehérje rapamicin hozzáadását követően transzlokálódott az ER membránjához, tehát a Nox4 N-terminális és p22^{phox} C-terminális oldalára fuzionált párja térben elérhető volt a citoszólikus komponens számára. Így a Nox4 N-terminusa és p22^{phox} C-terminális vége a citoszólban található.

Következtetések

Mutációanalízissel megállapítottuk, hogy az új, FRET elven működő PerFRET hidrogén-peroxid valós idejű szonda megfelelő működéséhez az összeépített Orp1 és Yap1 cisztein gazdag régióból mely ciszteinek esszenciálisak a megfelelő konformáció kialakításához. Az Orp1 és Yap1 három-három ciszteint tartalmaz, melyből HeLa sejteken, külső H_2O_2 hozzáadásával az Orp1 cisztein gazdag doménjében található 36-os pozíciójú, és a Yap1 620-as pozíciójú ciszteinje esszenciális. A szenzorban az Orp1 és a Yap1 cCRD doménjében a H_2O_2 oxidálja a cisztein oldalláncokat, melynek következtében kialakuló diszulfid hidak konformációváltozást eredményeznek, a rájuk fuzionált fluorofórok távolodnak és csökken az emissziójuk. A csökkenő FRET hányados arányos lesz H_2O_2 koncentrációval. A kombinált mutációkat tartalmazó szondák válaszai alapján a többi cisztein nem esszenciális, de a PerFRET maximális válaszkészségéhez szükségesek, hogy a megfelelő konformáció kialakítását további diszulfid hidakkal támogassák.

Kimutattuk, hogy a Nox4 humán primer dermális és pulmonáris fibroblasztokban TGF- β 1 hatására az extracelluláris térben detektálható mennyiségű hidrogén-peroxidot termel a kezelést követő 24. órában is. Genetikai modellekkel is megerősítettük, hogy a Nox4 aktivitásához a Nox4 és p22^{phox} egyidejű jelenléte szükséges.

Megállapítottuk, hogy a primer humán dermális és pulmonáris fibroblasztok a Nox4-en kívül nem fejeznek ki más NADPH oxidáz komplexet. Transzkripciós szintű vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a Nox4 oxidáz komplex nem igényel egyéb, a többi NADPH oxidáz rendszerekben előforduló citoszólikus alegységeket, illetve regulátorokat, csak a p22^{phox} jelenlétét. Ezt a megállapítást megerősítettük Nox4-gyet stabilan expresszáló HEK293FS sejtekben, ahol a Nox4 az endogén p22^{phox}-szal komplexet formálva H_2O_2 -ot termel.

Aszimmetrikus kapcsolatot írtunk le a Nox4 és p22^{phox} között: a Nox4 expressziójához és aktivációjához a p22^{phox} jelenléte és TGF- β 1 indukció is szükséges. A Nox4 mennyisége mRNA szintű vizsgálatainkban indukció nélkül alig kimutatható, míg a p22^{phox} kezdeti mennyisége mind mRNA szinten, mind fehérje szinten Western Blot kísérleteinkben is változatlan. Nem befolyásolta sem a Nox4 hiánya, sem TGF- β 1 indukció. Hasonló megfigyelést még egyik p22^{phox}-szal komplexet képző Nox-nál sem írtak le.

Bemutattuk, hogy epitóppal jelölt formában a Nox4 és p22^{phox} humán primer dermális és pulmonáris fibroblasztok endoplazmás retikulumának membránjában található. Új megközelítésben, egy kémiaileg indukálható rendszerben kimutattuk, hogy az ER membránjában összeépülő komplex H₂O₂ termelése az ER lumene felé irányul. Ezt közvetett úton, dermális fibroblaszt sejteken fluorimetriás méréssel is megerősítettük, ahol TGF- β 1 indukció hatására a HyPer1 hidrogén-peroxid szonda oxidáltsága nem változott egyik sejtalkotóban sem. A Nox4 által termelődött “extra” H₂O₂ nem emeli a citoszól oxidáltságát, így valószínűleg a termelés az ER luminális tere felé irányul.

A Nox4 NADPH oxidáz humán dermális és pulmonáris fibroblasztokban az ER membránjában található, a TGF- β 1 indukció hatására összeépülő, konstitutívan aktív komplex H₂O₂ termelése eddig ismeretlen csatornákon (útvonalon) ürül az extracelluláris térbe.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

1. **Zana M.**, Péterfi Z., Kovács H., Tóth E.Zs., Enyedi B., Morel F., Paclet M.H., Donkó Á., Morand S., Leto T.L., Geiszt M.

Interaction between p22phox and NOX4 in the endoplasmic reticulum reveals a novel mechanism of NADPH oxidase complex formation.

Free Radic Biol Med. 2018 Feb 20;116:41-49.

IF:6,02

2. Enyedi B., **Zana M.**, Donkó Á., Geiszt M.

Spatial and temporal analysis of NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide signals by novel fluorescent reporter proteins.

Antioxid Redox Signal. 2013 Aug 20;19(6):523-34.

IF:7,667

A témához tágabb körben kapcsolódó publikációk:

1. Sirokmány G., Pató A., **Zana M.**, Donkó Á., Bíró A., Nagy P., Geiszt M.

Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1

Free Radic Biol Med. 2016 Aug;97:204-11

IF: 5,606

2. Donkó Á., Morand S., Korzeniowska A., Boudreau H.E., **Zana M.**, Hunyady L., Geiszt M., Leto T.L.

Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2

Free Radic Biol Med. 2014 Aug;73:190-200.

IF: 5,736

