

ZÁRÓBESZÁMOLÓ

A pályázat címe: A WFIKKN fehérjék és a miosztatin, GDF11 közötti kölcsönhatás jellemzése

OTKA nyilvántartási száma: 72125

A kutatási téma ismertetése: előzmények és a kutatás célja

A WFIKKN1 és WFIKKN2 két egymással nagyfokú rokonságot mutató multidomén fehérje, melyeket néhány évvel ezelőtt a human genom bioinformatikai elemzésével azonosítottunk. Mindkét fehérje egy WAP-homológ, egy Follisztatin-homológ, egy Immunoglobulin-homológ, két Kunitz-típusú és egy NTR-homológ domént tartalmaz. A fehérjéket felépítő doménekkal rokon domének számos proteáz inhibitor fehérjében megtalálhatóak, ezért feltételeztük, hogy az új fehérjék proteáz inhibitorok, amelyek akár többféle proteáz gátlására is képesek lehetnek (Trexler M, Banyai L, and Patthy L. (2001) A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 3705-3709, Trexler M, Banyai L, Patthy L.(2002) Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. *Biol. Chem.* 383: 223-228).

Feltételezésünkkel összhangban, a WFIKKN1 második Kunitz-típusú doménjéről (KU2) kimutattuk, hogy valóban gátolja a tripszint, de nincs hatása több, tripszin-szerű szerin proteáz aktivitására (Nagy A, Trexler M and Patthy L (2003) Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. *Eur J Biochem* 270, 2101-2107). A WFIKKN1-KU2 fehérje térszerkezetének vizsgálata, valamint az a tény, hogy a WFIKKN1-KU2 tripszin gátlásának inhibíciós állandója (K_i) több nagyságrenddel magasabb, mint a BPTI tripszin gátlás K_i értéke, arra utal, hogy a WFIKKN1 fehérje elsődleges biológiai szerepe nem a tripszin gátlás (Liepinsh E, Nagy A, Trexler M, Patthy L, Otting G. (2006) Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein. *J Biomol NMR.* 35:73-8).

Néhány éve Hill és munkatársai humán szérumból a miosztatinhoz és GDF11 növekedési faktorhoz kötődő és azok aktivitását gátló fehérjeként izolálták a WFIKKN2-t. További vizsgálataikban kimutatták, hogy a WFIKKN2 gátolja a miosztatin és GDF11 aktivitását és az érett növekedési faktor mellett a miosztatin prodomén régiójával is kölcsönhatásba lép (Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. (2003) Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol.* 17:1144-1154).

A miosztatin/GDF8 és GDF11, a TGF β növekedési faktor családba tartozó, egymással nagy hasonlóságot mutató fehérjék. A miosztatin az izomfejlődést szabályozó, az izomnövekedést gátló fehérje. A miosztatin génben bekövetkező mutációk az izmok nagymértékű növekedése mellett a zsírlerakódás csökkenését okozzák. A GDF11 növekedési faktor szerepet játszik az idegsejtek differenciációjában, megakadályozza a PC12 sejtek neuron-szerű sejtekké alakulását. Mindkét fehérje aktív formája inaktív prekurzorból proteolitikus processzáls révén képződik. Egy furin típusú proproteín konvertáz hasításával képződő N-terminális prodomén és C-terminális érett növekedési faktor inaktív un. látens komplexet képez, amelyből a prodomén további proteolitikus degradációjával szabadul fel az

aktív növekedési faktor. A miosztatin és GDF11 prodomének degradációjában fontos szerepet játszanak a BMP1/Tolloid típusú metalloproteázok (Wolfman, N. M., McPherron, A. C., Pappano, W. N., Davies, M. V., Song, K., Tomkinson, K. N., Wright, J. F., Zhao, L., Sebald, S. M., Greenspan, D. S., and Lee, S. J. (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15842–15846; Ge, G., Hopkins, D. R., Ho, W. B., and Greenspan, D. S. (2005) GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5846–5858).

Kutatásunk célja a WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjék és a β -GFakádba tartozó növekedési faktorok, elsősorban a miosztatin/GDF8 és GDF11 közötti kölcsönhatás szerkezeti és funkcionális jellemzése volt.

Elért eredmények:

1. Rekombináns fehérjék előállítása

A vizsgálatokhoz használt növekedési faktorokat kereskedelmi forgalomból szereztük be, a többi fehérjét különféle expressziós rendszerek alkalmazásával laboratóriumunkban állítottuk elő. Létrehoztunk olyan *Drosophila* S2 sejteket, amelyek stabilan expresszálják a WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjéket.

Pichia pastoris szekréciónal expressziós rendszerben előállítottuk a WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjék különböző szakaszait tartalmazó fehérjéket: az egyetlen domént tartalmazó WFIKKN1_FS, WFIKKN1_KU2, WFIKKN1_NTR és WFIKKN2_NTR fehérjéket, és a két domént tartalmazó WFIKKN1_WAP-FS, WFIKKN1_KU1-KU2, WFIKKN1_KU2-NTR, WFIKKN2_WAP-FS és WFIKKN2_KU2-NTR fehérjéket. Ugyancsak *Pichia Pastoris* élesztő sejtekben expresszáltuk a miosztatin és GDF11 nagy affinitású receptorának, az Activin-Receptor IIb (ACRIIb) és a BMP2 és BMP4 növekedési faktorok nagy affinitású receptorának a BMPRIa extracelluláris, ligand-kötő doménjeit.

Megoldottuk a prepromiosztatin, a miosztatin prodomén, a miosztatin prodomén N-terminális és a miosztatin prodomén C-terminális régiójának bakteriális expresszióval történő előállítását.

A rekombináns fehérjék szerkezeti integritását CD spektroszkópiával és N-terminális aminosav szekvenálással ellenőriztük.

2. A WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjék és a miosztatin és GDF11 közötti kölcsönhatás jellemzése

Felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel jellemeztük a WFIKKN fehérjék és a miosztatin és GDF11 közötti kölcsönhatást. Megállapítottuk, hogy a WFIKKN2 fehérjéhez hasonlóan a WFIKKN1 fehérje is nagy affinitással köti a GDF8 és GDF11 növekedési faktorokat. Az SPR mérésekből számolt egyensúlyi disszociációs állandók azt mutatják, hogy a WFIKKN2 mindkét növekedési faktort erősebben köti, mint a WFIKKN1. A disszociációs állandókat az alábbi táblázat mutatja:

Kölcsönható fehérjék	K_d (M)	Kölcsönható fehérjék	K_d (M)
GDF8 – WFIKKN1	3.3×10^{-8}	GDF8 – WFIKKN2	2.8×10^{-10}
GDF11 – WFIKKN1	2.2×10^{-9}	GDF11 – WFIKKN2	1.6×10^{-10}

A miosztatin és a WFIKKN fehérjék különálló doménjeit vagy két tandem doménjét tartalmazó fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálatával azonosítottuk a növekedési faktor kötőhelyeket hordozó doméneket. Megállapítottuk, hogy a WFIKKN fehérjék elsősorban a FS doménjük révén kötik a miosztatint, de az NTR domén is részt vesz a kölcsönhatás kialakításában (**Kondás K, Szláma G, Trexler M, Patthy L. (2008) Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11. J Biol Chem. 283:23677-84).**

3. A WFIKKN fehérjék szerepe a miosztatin és GDF11 biológiai aktivitásának szabályozásában

Kompetíciós SPR mérésekkel vizsgáltuk, hogy a WFIKKN fehérjék kötődése a miosztatinhoz és GDF11-hez hogyan hat a növekedési faktorok és elsődleges, nagy affinitású receptoruk, az Activin-Receptor Iib közötti kölcsönhatásra. Kimutattuk, hogy a WFIKKN fehérjék valamint a Follisztatin homológ doménjeiket tartalmazó fragmensek gátolják a miosztatin és GDF11 kötődését az immobilizált ACR Iib extracelluláris, ligand-kötő doménjéhez. 20 nM WFIKKN1 vagy 12 nM WFIKKN2 fehérje jelenléte 50%-al csökkentette a miosztatin és a receptor közötti asszociáció sebességét. Hasonlóan, a GDF11 és a receptor közötti kölcsönhatást 40 nM WFIKKN1 vagy 5 nM WFIKKN2 gátolta 50 %-al. A növekedési faktorok és nagy affinitású receptoruk közötti kölcsönhatás kialakítására az NTR doméneknek nem volt hatása.

A WFIKKN fehérjék hatását a növekedési faktorok biológiai aktivitására emlős sejtenyészetben a miosztatin és GDF11 által kiváltott transzkripciós jelek detektálására alkalmas, a luciferáz riportergén expresszióján alapuló kísérleti rendszerben is vizsgáltuk. Mindkét fehérje hatékonyan gátolta a miosztatin és GDF11 növekedési faktorok által kiváltott jelátvitelt. 6 nM WFIKKN1 és 3 nM WFIKKN2 fehérje a miosztatin aktivitását a felére csökkentette. A WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjék a GDF11-nek is hatékony inhibitorai: 50 nM WFIKKN1 80%-al, 50 nM WFIKKN2 pedig 90%-al csökkentette a GDF11 aktivitását. (**Szláma G, Kondás K, Trexler M, Patthy L.(2010) WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGF β 1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. FEBS J. 277:5040-50).**

A három különböző vizsgálati rendszerben végzett méréseink egyértelműen és egymással összhangban azt bizonyítják, hogy mindkét WFIKKN fehérje hatékony antagonistája a miosztatin és GDF11 növekedési faktoroknak.

4. A WFIKKN fehérjék hatása más, a TGF β növekedési faktor családba tartozó növekedési faktor aktivitására

Megvizsgáltuk, hogy a WFIKKN fehérjék a miosztatin és GDF11 mellett hatnak-e más, a TGF β családba tartozó növekedési faktorokra. SPR mérésekkel kimutattuk, hogy mindkét fehérje jelentős affinitással köti a TGF β 1, BMP2 és BMP4 növekedési faktorokat ($K_d \sim 10^{-7}$ - 10^{-8} M). Gyengébb kölcsönhatást detektáltunk a BMP3 és BMP8b növekedési faktorokkal és nem volt mérhető kölcsönhatás az Aktivin A-val. Domén-szintű kölcsönhatás vizsgálatok szerint a WFIKKN fehérjék elsősorban az NTR doménjeik révén kötődnek a BMP2, BMP4, TGF β 1, BMP8b és BMP3 fehérjékhez.

Kölcsönható fehérjék	K_d (M)	Kölcsönható fehérjék	K_d (M)
BMP2 – WFIKKN1	7.2×10^{-7}	BMP2 -WFIKKN2	4.3×10^{-8}
BMP3 – WFIKKN1	3.3×10^{-6}	BMP3 -WFIKKN2	1.8×10^{-7}
BMP4 – WFIKKN1	8.2×10^{-7}	BMP4 -WFIKKN2	6.5×10^{-8}
BMP8b – WFIKKN1	3.0×10^{-5}	BMP8b -WFIKKN2	5.3×10^{-5}
TGF β 1 – WFIKKN1	4.5×10^{-7} 8.9×10^{-5}	TGF β 1 -WFIKKN2	2.8×10^{-8} 3.3×10^{-5}

A TGF β 1, BMP2 és BMP4 növekedési faktorok esetében is megvizsgáltuk, hogy a WFIKKN fehérjék kötődése a növekedési faktorokhoz hogyan befolyásolja a növekedési faktorok és nagy affinitású receptoruk közötti kölcsönhatás kialakulását. A kompetitív SPR mérések az mutatták, hogy a WFIKKN fehérjék a direkt kölcsönhatás mérésekből számított K_d értékek alapján vártnál jóval magasabb koncentrációnál – néhány μ M – gátolták a TGF β 1, BMP2 és BMP4 növekedési faktorok kötődését a TGF β -RII ill. BMPRIa receptorok extracelluláris doménjéhez. A TGF β 1, BMP2 és BMP4 növekedési faktorok biológiai aktivitásának detektálására alkalmas riporter vizsgálatokban nem tapasztaltunk gátlást. (Szláma, Gy., Kondás, K., Trexler, M. and Patthy, L.(2010) **WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGF β 1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. FEBS Journal 277, 5040–5050.**, Kondás, K., Szláma, Gy., Nagy A., Trexler, M. and Patthy, L (2011) **Biological function of the WAP domain containing multidomain proteins, WFIKKN1 and WFIKKN2.**, *Biochem Soc Trans.* 39:1416-20.)

Eredményeink azt mutatják, hogy a WFIKKN1 és WFIKKN2 a miosztatin és GDF11 növekedési faktorok specifikus inhibitorai, amelyek szerepet játszhatnak a miosztatin és GDF11 növekedési faktorok által szabályozott biológiai folyamatok finomhangolásában. Tekintettel arra, hogy a két fehérje expressziós mintázata eltér, a molekuláris szintű funkciójukban tapasztalt hasonlóság ellenére a fehérjék biológiai funkciója eltérő lehet: azt, hogy egy adott szövetben a két fehérje közül melyik vesz részt a miosztatin vagy GDF11 aktivitásának szabályozásában a fehérjék expressziója határozza meg.

A TGF β 1, BMP2 és BMP4 esetében a WFIKKN fehérjék nem gátolják a növekedési faktorok biológiai aktivitását, de feltételezzük, hogy a növekedési faktorok között kialakuló, a miosztatinhoz és GDF11-hez képest gyengébb kölcsönhatások elősegíthetik a növekedési faktor grádiensek kialakulását.

5. A WFIKKN fehérjék szerepe a miosztatin aktiválásában

Munkahipotézisünk szerint WFIKKN fehérjék elsődleges funkciója a miosztatin és GDF11 növekedési faktorok szabályozása. A miosztatin és GDF11 aktivitása több szinten szabályozható:

- gátolható a prekursor fehérjék proprotein konvertázok által történő hasítása, a látens komplex képződése
- gátolható a látens komplex proteolízise és az érett növekedési faktor felszabadulása
- gátolható az érett növekedési faktor és a receptor közötti kölcsönhatás kialakulása

Az 1.-4. pontokban ismertetett eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a WFIKKN fehérjék gátolják az érett növekedési faktorok és receptoraik közötti kölcsönhatás kialakulását. Feltételezzük, hogy a WFIKKN fehérjék szerepet játszanak a miosztatin – és GDF11- aktiválásához vezető proteolitikus folyamatok szabályozásában is.

Hill és munkatársai immunoprecipitációs pull-down kísérletekben azt tapasztalták, hogy a WFIKKN2 fehérje az érett miosztatin növekedési faktor mellett a miosztatin prodomént is kötötte. Ebből kiindulva SPR mérésekkel kimutattuk, hogy a WFIKKN1 fehérje is kölcsönhatásba lép a miosztatin prodoménjével, a kölcsönhatás egyensúlyi disszociációs állandója 4.85×10^{-7} M. Domén-szintű kölcsönhatás vizsgálatokból kiderült, hogy a kötés kialakításában a WFIKKN1 NTR doménjének van döntő szerepe (**Kondás K, Szláma G, Trexler M, Patthy L. (2008) Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11. J Biol Chem. 283:23677-84).**

Tekintettel arra, hogy a WFIKKN fehérjéket felépítő doménekkal rokon domének gyakran fordulnak elő proteáz inhibitor fehérjékben, feltételezzük, hogy a WFIKKN fehérjék szerepet játszanak a miosztatin – és GDF11- aktiválásához vezető proteolitikus folyamatok szabályozásában is. A miosztatin prodomén és a WFIKKN fehérjék közötti kölcsönhatás pedig biztosíthatja azt, hogy a WFIKKN fehérjéknek - az egyébként számos fehérje aktiválásában/processzálasában részt vevő - proprotein konvertázokra és/vagy BMP1/tolloid típusú metalloproteázokra kifejtett szabályozó hatása a miosztatin (és GDF11) aktiválódására korlátozódjék.

Ezért fontos a miosztatin– miosztatin prodomén – WFIKKN fehérjék közötti kölcsönhatás-viszonyok pontos felderítése. Bakteriális expresszióval előállítottuk a miosztatin prodomén N-terminális – T43-T115 aminosavak közötti szakasz – és C-terminális – E116-R266 aminosavak közötti szakaszt – tartalmazó régióját és vizsgáltuk kötődésüket a növekedési faktorhoz és a WFIKKN fehérjékhez. Az N-terminális 42-115 régióról eddig is ismert volt, hogy jelenléte nélkülözhetetlen a miosztatin és receptora közötti kölcsönhatás kialakulásának megakadályozásához (**Jiang MS, Liang LF, Wang S, Ratovitski T, Holmstrom J, Barker C, Stotish R. (2004) Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. Biochem Biophys Res Commun. 315(3):525-31.**). SPR mérésekkel megállapítottuk, hogy a prodomén N-terminális régiója kötődik a növekedési faktorhoz, de nem kötődik a WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjékhez. Ezzel ellentétben a C-terminális domén nem kötődött a miosztatinhoz, de nagy affinitással kötődött a WFIKKN1 fehérjéhez és a WFIKKN1_NTR doménhez.

Meglepetésünkre a miosztatin prodomén C-terminális régióját tartalmazó fehérje nem kötődött sem a teljes WFIKKN2-höz, sem a WFIKKN2_NTR-hez. Ezért ellenőriztük a miosztatin prodomén és a WFIKKN2 fehérje közötti kölcsönhatást: direkt SPR, kompetíciós SPR vizsgálatok és pull-down kísérletek is azt eredményezték, hogy a WFIKKN2 fehérje nem köti a miosztatin prodomént.

A miosztatin prodoménnel és fragmentjeivel végzett vizsgálataink kiderítették, hogy a miosztatin prodomén független kötőhelyeken keresztül kötődik a növekedési faktorhoz és a WFIKKN1 fehérjéhez, lehetővé téve egy miosztatin prodomén – miosztatin – WFIKKN1 fehérjékből álló terner komplex kialakulását. A terner komplexben a WFIKKN1 akár proteáz gátló aktivitás, akár szterikus gátlás révén befolyásolhatja/gátolhatja a prepromiosztatin és/vagy a látens komplex aktiválását végző proteázt. Az a tény, hogy a WFIKKN1 fehérje kölcsönhat a miosztatin prodoménnel, míg a WFIKKN2 nem, arra utal, hogy a két fehérje eltérő szerepet játszhat a miosztatin aktiválódás szabályozásában.

Megvizsgáltuk a WFIKKN1 és WFIKKN2 fehérjék hatását a miosztatin aktiválódásában részt vevő furin proteolitikus aktivitására. A WFIKKN fehérjék nem gátolták a furin aktivitását a specifikus, kis méretű peptid szubsztrát esetében, és nem befolyásolták prepromiosztatin hasítását sem.

Azok a vizsgálatok, amelyek célja a WFIKKN fehérjéknek a látens komplex aktiválására képes BMP1 metalloproteáz aktivitására gyakorolt hatásának kiderítése, még nem zárultak le.

A kutatási téma további lehetséges irányai:

A WFIKKN fehérjéknek a miosztatin és GDF11 aktiválódásában játszott szerepének kiderítése mellett egy új OTKA pályázat keretében tisztázni szeretnénk a fehérjéknek az embrionális fejlődésre és a különböző, a vázizomzattól eltérő szövetekre kifejtett hatását.

Az újabb kutatási eredményekből úgy tűnik, hogy a miosztatin funkciója nem korlátozódik az izomsejtek proliferációjának és differenciációjának szabályozására, hanem szerepet játszik a szervezet izomszövet – zsírszövet tömegének/arányának szabályozásában is. A GDF11 biológiai funkciójáról kevesebb ismerettel rendelkezünk, az eddig ismert adatok azt mutatják, hogy a GDF11 az idegi fejlődés, neuron differenciáció negatív regulátora. Mindkét növekedési faktor olyan folyamatokat szabályoz, amelyek szorosan kapcsolódnak korunk legnagyobb egészségügyi problémáihoz. Ezért a miosztatin és GDF11 aktivitását befolyásoló mechanizmusok, így többek között a WFIKKN fehérjék hatásmechanizmusának kiderítése népegészségügyi szempontból is fontos.

Eltérések a beadott munkatervtől:

1. A beadott munkatervtől eltérően nem tudtuk vizsgálni a WFIKKN fehérjék és a GDF11 prodomén közötti kölcsönhatást, mert nem sikerült rekombináns GDF11 prodomént előállítanunk. A GDF11 prodomén fehérjét *E. coli* baktériális expressziós rendszerekben, *Pichia pastoris* élesztőben és *Drosophila* S2 sejtekben is megkíséreltük előállítani. Sem a laboratóriumunkban számos fehérje esetében sikeresen alkalmazott *Pichia pastoris* szekréción rendszer, sem a *Drosophila* S2 sejtek nem szekretáltak GDF11 prodomén fehérjét a táptalajba. Bakteriális expressziós rendszerek közül a pPR-IBA2 vektorral sikerült fehérjét expresszálni, azonban a képződött fehérje inklúziós testekben kicsapódott és különböző

renaturációs-refoldálási eljárásokat/körülményeket alkalmazva sem tudunk stabil, natív térszerkezetű fehérjét előállítani.

2. A GDF8 és GDF11 egymással közeli rokonságot mutató tagjai a TGF β növekedési faktor családnak. Bár munkatervünkben nem szerepelt, mégis – a WFIKKN fehérjék specificitása szempontjából - fontosnak tartottuk annak tisztázását, hogy a GDF8 és GDF11 mellett hatnak-e a WFIKKN fehérjék más TGF β családba tartozó növekedési faktor aktivitására. Ezért vizsgáltuk a WFIKKN fehérjék kölcsönhatását a BMP2, BMP4, BMP8b, BMP3, TGFbeta1, és Activin A növekedési faktorokkal és hatásukat a TGFbeta1, BMP2 és BMP4 növekedési faktorok biológiai aktivitására. Eredményeinket a **Szláma, Gy., Kondás, K., Trexler, M. and Patthy, L.(2010) WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFb1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. FEBS Journal 277, 5040–5050** közleményben ismertettük.