

A KIMOTRIPSZIN C SZABÁLYOZÓ SZEREPÉNEK ÉS N-GLIKOZILÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori tézisek

Bence Melinda

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Pathobiokémia Doktori Program



Témavezető: Dr. Sahin-Tóth Miklós

Hivatalos Bírálók: Dr. Gál Péter

Dr. Lakatos Péter László

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tretter László

Dr. Venekei István

Budapest

2011

*Az értekezés kísérleti anyaga a Boston University Department of
Molecular and Cell Biology tanszékén készült Dr. Sahin-Tóth
Miklós laboratóriumában*

BEVEZETÉS

A kimotripszin C (CTRC) a hasnyálmirigyben termelődő szerin-proteáz, amely a táplálékkal bevitt fehérjék emésztése mellett részt vesz a kationos tripszin aktivációjának illetve degradációjának szabályozásában. A CTRC tripszin degradáló szerepe védelmet biztosíthat a tripszinogén hasnyálmirigyen belül fellépő korai aktiválódása és így a hasnyálmirigy-gyulladás (pankreatitisz) kialakulása ellen. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a CTRC funkcióvesztő mutációi növelik a krónikus pankreatitisz kialakulásának esélyét. A mutációk az esetek többségében csökkent enzimaktivitáshoz, illetve a fehérje hibás feltekeredéséhez és elégtelen szekréciójához vezetnek. Ugyanakkor a CTRC mutációinak következtében hibásan feltekeredett fehérjék endoplazmás retikulum stresszt és apoptózist válthatnak ki az acinus sejtekben, ami szintén hozzájárul a hasnyálmirigy károsodásához.

Mindezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy a CTRC esetleg más hasnyálmirigy eredetű enzimek aktivitásának szabályozásában is részt vesz. Doktori munkám során a CTRC prokarboxipeptidáz aktivációjára gyakorolt hatását vizsgáltam. A CTRC egy szekretoros fehérje, így nagy valószínűséggel keresztülmegy N-glikoziláción. Munkám további részében a CTRC esetleges N-glikozilációját és annak szerepét tanulmányoztam.

A hasnyálmirigy eredetű karboxipeptidázok metalloproteázok, amelyek exopeptidáz aktivitással rendelkeznek és a fehérjék C-terminális végét hasítják. A humán hasnyálmirigyben három karboxipeptidáz-izofорма található: a CPA1, CPA2 illetve a CPB1. Mindegyikük inaktív proenzim formájában termelődik a

hasnyálmirigy acinus sejtjeiben. A prokarboxipeptidáz inaktivitásáért az enzim 94-96 aminosav hosszúságú N-terminális propeptidje felelős, amely a karboxipeptidáz inhibitoraként működik. A propeptid egy inhibitoros globuláris doménből áll, amelyet egy α -hélix szegmens kovalensen kapcsol az enzimhez. A jelenlegi irodalom szerint a prokarboxipeptidáz aktivációjának első lépése az α -hélix C-terminálisának tripszin általi hasítása. Ennek eredményeként az α -hélix destabilizálódik és az inhibitoros globuláris domén disszociálódik az enzimről. Az aktivációs folyamatban a tripszinen kívül egyes elasztáz és kimotripszin izoformák szerepét is kimutatták, azonban ezek a tanulmányok nem tisztázták az aktiváció pontos mechanizmusát illetve az enzimek hasítási helyeit.

A szekretoros fehérjék jelentős része keresztülmegy N-glikoziláción, miközben a naszcens polipeptidlánc az endoplazmás retikulum lumenébe transzlokálódik. Az N-glikoziláció során az egységes szerkezetű oligoszacharid-lánc a fehérjék Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvenciájának aszparagin-oldalláncához kapcsolódik. A fehérjékhez kapcsolódó oligoszacharid számos funkciót tölthet be, többek között elősegíti a fehérjék foldingját, sejten belüli transzportját és szekréciónak. A glikozil-csoport egyrésztől közvetlen hatást gyakorolhat a fehérjeláncra, azonban különböző chaperonok, lektinek kötődését is lehetővé teszi. Emellett az oligoszacharid-oldallánc befolyással lehet az érett fehérjék stabilitására valamint specifikus funkcióikra is. A humán illetve egyéb emlős fajok CTRC-jének elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több potenciális N-glikozilációs hely található, azonban jelenleg nem ismert, hogy ezek a konszenzus szekvenciák valóban hordoznak-e glikozil-csoportot.

CÉLKITŰZÉSEK

A jelen dolgozatban bemutatásra kerülő munka célkitűzései a következők voltak:

1. A CTRC prokarboxipeptidáz aktivációjában betöltött szerepének vizsgálata

1.1. A CTRC hatásának vizsgálata a proCPA1, proCPA2 és proCPB1 aktivációjára

1.2. A CTRC hatásának vizsgálata a proCPA1, proCPA2 és proCPB1 tripszin általi aktivációjára

1.3. A prokarboxipeptidáz aktivációs mechanizmusának pontos feltárása és a propeptid tripszin illetve CTRC általi hasítási helyeinek meghatározása

2. A CTRC N-glikozilációjának vizsgálata

2.1. A humán CTRC N-glikoziláltságának vizsgálata: annak meghatározása, hogy a három potenciális N-glikozilációs hely közül melyek hordoznak ténylegesen glikozil-csoportot

2.2. Az N-glikoziláció hatásának vizsgálata a CTRC feltekeredésére illetve szekréciójára

2.3. Az N-glikoziláció hatásának vizsgálata a CTRC aktivitására és inhibitor-kötésére

2.4. Különböző fajokban található CTRC-fehérje N-glikozilációjának összehasonlító vizsgálata

2.5. Annak meghatározása, hogy a glikozil-csoport pozíciójának van-e jelentősége a CTRC szekréciójára és aktivitására

MÓDSZEREK

Plazmidok készítése és transzfektálása

A humán embrionális vesesejtek (HEK 293T) transzfektálásához eukarióta expressziós vektort használtunk. A patkány eredetű acinus sejteket (AR42J) adenovírus segítségével infektáltuk. A génvariánsokat PCR-mutagenezissel állítottuk elő.

Fehérjetermelés és -tisztítás

A proenzimeket HEK 293T sejtekben termeltettük tranziens transzfekció segítségével. A sejtek kondicionált médiumából a kimotripszinogén C-t ecotin-affinitáskromatográfiával tisztítottuk. A prokarboxipeptidázt tartalmazó kondicionált médiumot Tris-HCl (pH 8,0) oldattal szemben dializáltuk, majd ioncserés kromatográfiával tisztítottuk MonoQ anioncserélő oszlop segítségével.

A karboxipeptidáz aktiválódásának vizsgálata

A tripszinnel illetve CTRC-vel inkubált CPA1, CPA2 és CPB1 aktivitását fotometriás módszerrel, szintetikus kromogén szubsztrát hasításának sebességével mértük. A proCPA aktiválódásának folyamatát SDS-gélen is nyomon követtük. A propeptid tripszin illetve CTRC általi hasítóhelyeit A. Carpentieri és C. E. Costello (Boston University) határozta meg tömegspektrometria módszerével.

A CTRC szekréciójának vizsgálata

A HEK 293T és az AR42J sejteket tranziensen transzfektáltuk a vad típusú illetve a mutáns CTRC cDNS-t tartalmazó konstrukciókkal. A CTRC szekrécióját a transzfekciót követően 48 órán keresztül követtük a sejtek médiumából történő mintavétellel. A médiumba szekretált fehérje mennyiségét SDS-gélelektroforézissel illetve a CTRC aktivitásának mérésével határoztuk meg.

Az ER-stressz marker-gének expressziójának vizsgálata

A CTRC-variánsokkal transzfektált AR42J sejteket a transzfekció követően 24 órával gyűjtöttük be. A sejtek kivonatából összRNS-t izoláltunk majd reverz transzkripció segítségével cDNS-t készítettünk. Az XBP1 transzkripciós faktor mRNS-mennyiségét szemikvantitatív PCR segítségével, míg a BiP, calnexin és calreticulin chaperonok mRNS-mennyiségét valós idejű PCR-rel határoztuk meg.

A kimotripszinogén C deglikozilációja

A CTRC variánsokkal transzfektált HEK 293T sejtek médiumát PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimekkel való inkubációt követően SDS-gélen megfuttatuk, majd a fehérjéket Coomassie Blue-val festettük. Az enzimek által eltávolított glikozil-csoport hiánya az SDS gélen kimutatható molekulatömeg-csökkenést idéz elő.

A CTRC enzim funkcióinak vizsgálata

A kinetikai paraméterek meghatározásához a felaktivált CTRC-t növekvő koncentrációjú szubsztrátoldattal reagáltattuk. A reakcióhoz szintetikus kromogén szubsztrátot használtunk, melynek hasítási sebességét fotométer segítségével határoztuk meg. Az aktivitás adatokat (mOD/perc) a szubsztrát-koncentráció függvényében ábrázoltuk, majd az így kapott pontokra hiperbolát illesztettünk. A hiperbola egyenlete alapján meghatároztuk a V_{\max} és K_M -értékeket és a k_{cat}/K_M specificitás konstanszt. A CTRC aktivitását természetes szubsztrátjai, a β -kazein és humán kationos tripszinogén felhasználásával is nyomon követtük SDS-gélen. A CTRC-inhibitor disszociációs állandóját (K_i) a *Schistocerca gregaria* kimotripszin-inhibitor (SGCI) segítségével határoztuk meg a Laskowski-laboratóriumban kidolgozott módszer alapján.

EREDMÉNYEK

1.1. A proCPA1 illetve proCPA2 humán kationos tripszin általi aktivációjának SDS-gélen való vizsgálata során megállapítottuk, hogy a tripszin mindkét proCPA izoformáról lehasítja a propeptidet, amely stabil maradt a reakció során. A propeptid tömegspektrometriai analízise alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a tripszin a propeptid α -hélixének C-terminális végéhez közel eső arginin aminosavak után szekvenciális módon hasít.

1.2. Aktivitásméréseink alapján a CTRC önmagában nem képes a proCPA illetve a proCPB aktiválására. Tripszinnel való inkubálást követően azonban a CTRC tízszeresére növelte a CPA1 és a CPA2 aktivitását, ugyanakkor a proCPB1 tripszin általi aktivitását nem befolyásolta. A CTRC-n kívül más hasnyálmirigy eredetű enzimek, így a humán elasztáz 2A/3A/3B, kimotripszin B1/B2 és a kimotripszinszerű enzim-1 hatását is megvizsgáltuk. Ezek az enzimek a CTRC-vel ellentétben csak kis mértékben növelték meg a tripszinnel előemésztett CPA1/CPA2 aktivitását.

1.3. A CPA1 illetve a CPA2 tripszin és CTRC általi aktivációjának SDS-gélen való vizsgálata kimutatta, hogy a CTRC hozzáadását követően a propeptid mindkét enzim esetében teljes mértékben degradálódik. A tömegspektrometriai mérések alapján a CTRC szintén a propeptid α -hélixének C-terminális végét hasítja, majd ezt követi az α -hélix N-terminális végének hasítása. Végül az inhibitoros globuláris domén is degradálódik. Ebben a folyamatban a tripszin, a CTRC, illetve maga az aktív CPA is részt vesz.

2.1. Megállapítottuk, hogy a humán CTRC három potenciális N-glikozilációs helye közül egyedül az 52-es aszparagin hordoz

ténylegesen glikozil-csoportot, mivel az Asn52 aminosav cseréje (N52S) jelentős molekulatömeg-csökkenést idéz elő. PNGaseF és EndoH glikozidáz enzimekkel igazoltuk, hogy a molekulatömeg csökkenését a glikozil-csoport hiánya okozta.

2.2. A glikozilálatlan N52S mutáns CTRC a vad típushoz képest kisebb mennyiségben szekretálódott a HEK 293T és az AR42J sejtekben. Eredményeink szerint az N52S mutáns overexpressziója ER-stresszt vált ki AR42J sejtekben, amelyet a BiP és calretikulin gének intenzív expressziója, illetve az érett XPB1 splice variáns mennyiségének megnövekedése igazol.

2.3. A glikoziláció megléte nem befolyásolta a CTRC enzim kinetikai paramétereit és a β -kazein illetve a tripszinogén szubsztrátok emésztését. A vad típusú és az N52S fehérje SGCI kimotripszin-inhibitorral meghatározott K_i -értéke ugyancsak azonosnak bizonyult.

2.4. Kritikus funkciója ellenére az Asn52 glikozilációs hely nem konzervált a különböző emlős fajok CTRC aminosav-szekvenciájában. Vizsgálataink szerint a patkány CTRC az Asn90-es pozícióban hordoz glikozil-csoportot, amely szintén szükséges a fehérje normál szekréciójához, de az enzim funkciókra nincsen hatással. Ezzel szemben a szarvasmarha CTRC nem rendelkezik glikozil-csoporttal.

2.5. A glikozil-csoport pozíciójának jelentőségét humán CTRC-n vizsgáltuk, amelyben az Asn52-es glikozilációs helyet mutagenézis segítségével a patkány CTRC-ben található Asn90-es helyre cseréltük. Az újonnan létrehozott konszenzus szekvencia sikeresen keresztülment glikoziláción, azonban a fehérje szekréciója csupán 40 %-a volt a vad típusú CTRC esetén mért értéknek.

KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk eredményeként bizonyítást nyert, hogy a CTRC a proCPA1 illetve a proCPA2 fiziológias koaktivátora. A CTRC önmagában nincsen hatással a proCPA aktivitására, azonban annak tripszin általi aktivációját tízszeresére növeli. Ugyanakkor a CTRC a proCPB1 tripszin általi aktivitását nem befolyásolja.

A proCPA aktiválódása egy többlépcsős folyamat, amelynek során a propeptid α -hélixének C-terminális szakaszát először a tripszin hasítja. Az emésztett propeptid továbbra is megőrzi az inhibitoros hatását, azonban a kötési affinitása csökken, és ennek következtében egy körülbelül 10 %-os karboxipeptidáz-aktivitást figyelhetünk meg. A triptikus hasítás fellazítja az α -hélixet, ami lehetővé teszi a propeptid CTRC általi hasítását. A CTRC az α -hélixet először szintén a C-terminális végén hasítja, amelyet az N-terminális vég hasítása követ. Ezek a hasítások destabilizálják az α -hélixet, aminek következtében a propeptid globuláris doménje lehasad, majd degradálódik. Az inhibitoros globuláris domén lebontásában a tripszin, CTRC illetve maga az aktív CPA is részt vesz. A globuláris domén lebomlását követően a CPA teljes mértékben felszabadul a gátlás alól.

Eredményeink tehát megerősítették laboratóriumunk korábbi megfigyelését, amely szerint a CTRC a táplálékkal bevitt fehérjék emésztése mellett fontos szabályozó szerepet játszik egyéb hasnyálmirigy eredetű enzimek aktivációjának és degradációjának szabályozásában. A CTRC egyedülálló szabályozó szerepe valószínűleg a specificitásában rejlik, mivel semelyik másik

pankreatikus emésztőenzim sem képes a CTRC-specifikus szabályozó helyeket jelentősebb mértékben hasítani.

Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a CTRC három potenciális N-glikozilációs helye közül egyedül az Asn52 hordoz ténylegesen glikozil-csoportot.

A glikozil-csoport elengedhetetlen a CTRC normál szekrécijához. A glikozilálatlan N52S mutáns CTRC túltermelése endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt vált ki, ami nagy valószínűséggel a hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódásának köszönhető. Ennek megfelelően tehát a humán CTRC N-glikozilációja minden bizonnyal a fehérje megfelelő feltekeredését segíti elő.

Annak ellenére, hogy az Asn52 egy felszíni hurokban helyezkedik el, amely részt vesz a szubsztrát megkötésében, az N-glikán megléte nem befolyásolja a CTRC enzimaktivitását, szubsztrát-specifitását, illetve inhibitor-kötését.

Összehasonlító vizsgálataink szerint a különböző emlős fajokban található CTRC glikozil-csoportjának pozíciója illetve a glikoziláció mértéke és megléte a fehérjék nagyfokú hasonlósága ellenére eltérő.

Megállapítottuk továbbá, hogy az N-glikán pozíciója kritikus a humán CTRC megfelelő feltekeredése és szekrécója szempontjából.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés anyagát képező közlemények

Bence M, Sahin-Toth M. Asparagine-linked glycosylation of human chymotrypsin C (CTRC) is required for folding and secretion but not for enzyme activity. FEBS J. 2011; 278:4338-4350. (IF: 3,129)

Szmola R*, **Bence M***, Carpentieri A, Szabo A, Costello CE, Samuelson J, Sahin-Toth M. Chymotrypsin C is a co-activator of human pancreatic procarboxypeptidases A1 and A2. J. Biol. Chem. 2011; 286:1819-27. (IF: 5,328) * megosztott elsőszervezők

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

Bence M, Koller J, Sasvari-Szekely M, Keszler G. Modulation of monoaminergic neurotransmission by inhibition of histone deacetylases. J Neural Transm. 2012;119:17-24. (IF: 2,597)

Bence M, Kereszturi E, Mozes V, Sasvari-Szekely M, Keszler G. Hypoxia-induced transcription of dopamine D3 and D4 receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cells. BMC Neurosci. 2009;10:92. (IF: 2,744)

Mózes V, **Bence M**, Sasvári-Székely M, Keszler G. Dopamine D4 receptor hypoxia sensitivity and child psychiatric disorders. Neuropsychopharmacol Hung. 2010 Mar 12(1):289-93. (IF:0,0)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Prof. Mandl Józsefnek, Intézetünk igazgatójának, hogy tanulmányaimat a Pathobiokémia doktori programban folytathattam és az általa vezetett intézetben dolgozhattam.

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Sahin-Tóth Miklósnak, hogy tézismunkámat laboratóriumában végezhettem és szakmai tanácsaira, ötleteire mindvégig számíthattam.

Köszönettel tartozom Prof. Sasvári Máriának, támogatásáért és hogy laboratóriumában, irányítása alatt kezdhettem meg doktoranduszi munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Keszler Gergelynek, amiért ötleteivel, tanácsaival segítette a Sasvári-laboratóriumban végzett munkámat. Hálával tartozom önzetlen segítségéért és barátságáért.

Köszönettel tartozom Dr. Kereszturi Évának és Dr. Rónai Zsoltnak, mindkét laboratóriumban nyújtott segítségükért, támogatásukért és barátságukért.

Szeretném megköszönni a Sahin-Tóth-laboratórium volt és jelenlegi tagjainak: Dr. Sebastian Beer-nek, Geisz Andreának, Dr. Németh Balázsnak, Sahin-Tóth Verának, Schnúr Andreának, Dr. Szabó Andrásnak, Dr. Szmola Richárdnak és Dr. Jiayi Zhou-nak szakmai segítségüket és barátságukat.

Köszönettel tartozom a Sasvári-laboratórium valamennyi eddig nem említett tagjának: Abdul Rahman Omarnak, Dr. Barta Csabának, Garai Cintióának, Héjjas Krisztinának, Dr. Nagy Rékának, Dr. Nemoda Zsófiának, Dr. Szántai Eszternek, Dr. Szpaszokukockaja Tatjánának és Virga Sándornének, hogy segítségükre mindig számíthattam és hogy mindvégig kellemes légkörben dolgozhattam.