

EXPRESIA A PURIFIKÁCIA TIOREDOXÍNU 2 A TIOREDOXÍNU 3 ZO *Streptomyces coelicolor* A3(2)

MICHAELA KOHÁRYOVÁ^a, IMRICH BARÁK^b
a MARTA KOLLÁROVÁ^a

^a Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina CH1, 842 15 Bratislava, ^b Ústav molekulárnej biológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta, 845 51 Bratislava

koharyova@fns.uniba.sk, kollarm@fns.uniba.sk

Došlo 23.2.11, prijaté 3.5.11.

Kľúčové slová: tioredoxínový systém, tioredoxín

Úvod

V cytoplazme buniek sa bežne vyskytujú dva typy redoxných systémov, ktoré regulujú oxidačno-redukčný stav iných proteínov – tioredoxínový (Trx) a glutatióglutaredoxínový (GSH-Grx) systém¹. *Streptomyces coelicolor* A3(2) (podobne ako všetky streptomycéty) predstavuje vhodný modelový organizmus pre štúdium Trx systému, pretože táto gram-pozitívna pôdna baktéria nemá funkčný GSH-Grx systém, nedokáže syntetizovať glutatión. Miesto neho má k dispozícii nízkomolekulový monotiol obsahujúci sacharid, nazývaný mykotiól. Úlohu má podobnú ako glutatión, je redoxným „pufrom“ a chráni aktinomycéty voči toxicite vyvolanej kyslíkom. Redoxná regulácia streptomycét je však výlučne pod kontrolou Trx systému pozostávajúceho z tioredoxínu, tioredoxín reduk-tázy (TrxR) a koenzýmu NADPH².

V mnohých organizmoch sú mnohé funkcie zastúpené iba jediným funkčným tioredoxínom. V genóme *S. coelicolor* A3(2) však bolo identifikovaných viacero tioredoxínových génov. Z toho tri gény kódujú tioredoxíny (Prístupové čísla: TrxA – SCO3889, TrxA2 – SCO5438, TrxA3 – SCO0885), ďalšie dva kódujú pravdepodobne tioredoxíny (Prístupové čísla: SCO1084 a SCO5419), jeden gén kóduje TrxR (Prístupové číslo: SCO3890) a dva gény kódujú pravdepodobne TrxR (Prístupové čísla: SCO6834 a SCO7298). Predpokladá sa, že všetky gény kódujú proteíny s očakávanými oxido-redukčnými schopnosťami a to predovšetkým vďaka ich dvom cysteínom lokalizovaným v aktívnom mieste. Ich biologická úloha ostáva však nezodpovedaná.

Redukovaná forma [Trx-(SH)₂] obsahuje dve tiolové skupiny, ktoré môžu byť efektívne využité a katalyzovať redukciu mnohých vystavených disulfidov. Z tohto dôvodu Trx môže interagovať s množstvom proteínových substrátov dvoma spôsobmi: Prvým je interakcia so substrátom prostredníctvom elektrónového transportu a to: reguláciou

aktivity jednoduchým redoxným mechanizmom založenom na reverzibilnej oxidácii dvoch tiolových skupín cysteínov na disulfid, sprevádzanej prenosom dvoch elektrónov a dvoch protónov. Druhým je štruktúrna modulácia proteínovej aktivity, naviazaním na substrát.

Všetky tioredoxíny sa sekvenčne podobajú v rozmedzí od 27–69 % najlepšie preštudovanému tioredoxínu pochádzajúcemu z *E. coli*³. Tioredoxíny sa vyznačujú veľmi podobnou 3D štruktúrou, nazvanou „Trx fold“⁴. Trojrozmernú štruktúru tioredoxínu tvorí päť centrálnych β-listov, obklopených štyrmi α-helixami⁵. Aktívne miesto je zložené z dvoch susediacich cysteínov vo vysoko konzervovanom motíve, -Cys-Gly-Pro-Cys-. Oxidovaná forma proteínu je redukovaná elektrónmi z NADPH cez flavínový enzým TrxR.

Fyziologické funkcie tioredoxínu v rôznych organizmoch sú veľmi rôznorodé. Od bežných základných redukčných reakcií po veľký počet odlišných špecializovaných funkcií, zahŕňajúc ich konzervovanú úlohu ako vysokokapacitný vodíkový donorový systém pre redukujúce enzýmy (napr. jeho úloha v syntéze DNA pre jeho schopnosť pôsobiť ako vodíkový donor pre esenciálny enzým ribonukleotidreduktázu) ako aj vysokošpecializovanú funkciu napr. v replikácii T7 fágovej DNA. Ukázalo sa, že chloroplastové fotosyntetické enzýmy aktivované svetlom sú tiež regulované cez tiolovú redoxnú kontrolu. V posledných rokoch sa výskum zaoberá hlavne úlohou tioredoxínu ako ochrancu pri oxidačnom strese a jeho funkciou pri kontrole programovanej bunkovej smrti, apoptózy⁶. Tieto funkcie závisia od disulfidreduktázovej aktivity tioredoxínu, ale aj od zásoby NADPH a aktivity tioredoxínreduktázy.

Vzhľadom na zložitý životný cyklus sa predpokladá, že streptomycéty budú mať aj komplexný redoxný systém. Paget a spol. vo svojej práci zistili, že vystavenie hýf *S. coelicolor* priamemu oxidačnému stresu spôsobí intracelulárnu oxidáciu tiolov. Tento stav aktivuje σ^R faktor, podporujúci produkciu Trx a TrxR a aj samotného σ^R faktora⁷. σ^R faktor (25 kDa), kódovaný genóm *sigR* bol u *S. coelicolor* identifikovaný ako súčasť systému, ktorý vníma a odpovedá na stav, kedy dochádza k oxidácii tiolov a to priamou reguláciou transkripcie génov, ktoré sú zahrnuté v uchovávaní tiol-disulfidovej redoxnej homeostázy. Predpokladá sa, že existencia značného množstva sigma faktorov reagujúcich na stres, môže zodpovedať za nezávislú reguláciu rôznych stresových regulónov v *S. coelicolor*⁸. Až 45 rôznych opísaných ECF sigma faktorov dokáže reagovať na externé stimuly a sú schopné aktivovať gény zahrnuté: v disulfidovom strese, uchovávaní homeostázy bunkovej steny a tiež gény využívané pri vývoji vzdušného mycélia⁹.

Keďže v *S. coelicolor* bol preštudovaný zatiaľ iba jeden tioredoxín (TrxA, SCO3889) a čiastočne TrxR (SCO3890)¹⁰, v práci sme sa zamerali na preštudovanie ďalších dvoch tioredoxínov označených ako TrxA2 a TrxA3.

Materiál a metódy

Chemikálie

V práci sme použili komerčne dostupné chemikálie a reagenty analytickej kvality.

Bakteriálne kmene a plazmidy

Všetky použité bakteriálne kmene a plazmidy sú zhrnuté v tab. I. Spóry kmeňa *Streptomyces coelicolor A3 (2)* sme získali darom od prof. D. A. Hopwooda a boli kultivované podľa Hopwooda a spol.¹¹. Bunky *E. coli* boli kultivované pri teplote 37 °C v LB médiu s 100 µg ml⁻¹ ampicilínom prípadne ak obsahovali plazmid pET-15b (cit.¹²).

Amplifikácia, klonovanie a expresia

Genómová DNA *S. coelicolor A3(2)* bola izolovaná postupom podľa Hopwood a spol.¹¹. Na PCR reakciu boli použité oligonukleotidové primery TrxA2S: AGA AGA AGC ATA TGC CCG AGG TGA CGG AC, TrxA2E: GAA GAA GAG GAT CCT CAG ACC ACG TCG GC, TrxA3S: GGA ATT CCA TAT GAC CAG CAC CGT GGA ACT, TrxA3E: CGC GGA TCC CTA CTG GCC TTC CTG GCC. Primery boli navrhnuté podľa DNA sekvencií génov *trxA2* (SCO5438) a *trxA3* (SCO0885). Ako templát sa použila genómová DNA. Amplifikované gény boli klonované do expresného plazmidu pET-15b cez klonovacie miesta BamHI a NdeI na 5' a 3'-koncoch. Rekombinantným plazmidom pET-15b-TRxA2 alebo pET-15b-TRxA3 boli transformované bunky *E. coli* BL21(DE3). Takto pripravené nadprodukčné kmene *E. coli* BL21-*trxA2* a *E. coli* BL21-*trxA3* rástli v LB médiu s 100 µg ml⁻¹ ampicilínom pri teplote 37 °C do OD 0,6–0,7. Do takto narastených kultúr sme pridali izopropyl-1-tio-β-D-galaktopyranozid (IPTG) do výslednej koncentrácie 1 mM a inkubovali sme ďalšie 3 h za rovnakých podmienok. Bunky boli usadené centrifugáciou a pelety uskladnené pri teplote –20 °C.

Tabuľka I

Zoznam použitých bakteriálnych kmeňov a plazmidov

Kmeň/Plazmid	Popis	Zdroj
<i>Kmene</i>		
<i>E. coli</i> MM294	F ⁺ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K⁻m_K⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i>	firma Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsd_B(r_B⁻m_B⁻)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	firma Novagen
IB 988	nadexpresný kmeň pre TrxA zo <i>S. coelicolor</i>	citácia 10
IB 989	nadexpresný kmeň pre TrxR zo <i>S. coelicolor</i>	citácia 10
<i>Plazmid</i>		
pET-15b	P _{T7} – expresný vektor, ktorý pridáva na N-koniec proteínov sekvenciu His.Tag	firma Novagen

Purifikácia a imunodetekcia TrxA2 a TrxA3

Pelety buniek *E. coli* IB831 boli suspendované v roztoku obsahujúcom 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a 2 mM EDTA a disruptované použitím Soniprep 150 (MSE, Crawley, Veľká Británia). Cytoplazmatickú frakciu s nadproduktovanou MDH sme získali po ultracentrifugácii pri 39 000 g použitím ultracentrifúgy Beckman L8-50M/E (Beckman PA, CA, USA). Supernatanty boli aplikované na špecifické chelatačné kolóny His.Bind Resin (Novagen, USA). Po vyplavení nešpecifických proteínov a zvyšovaním koncentrácie imidazolu v rozmedzí od 100 do 400 mM boli postupne eluované rekombinantné bielkoviny. Všetky frakcie boli analyzované na 12–15% SDS-PAGE géloch a farbené Coomassie Brilliant Blue R-250 (cit.¹³).

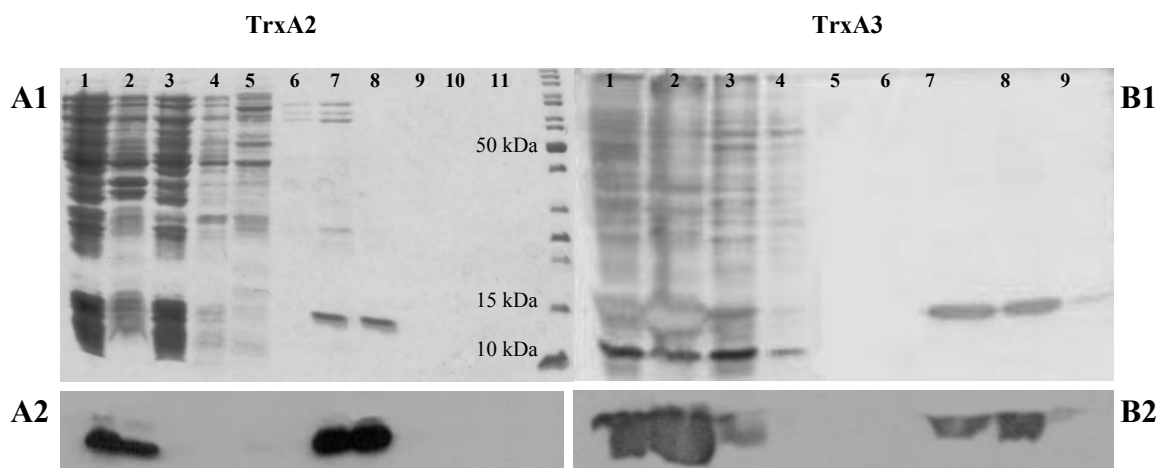
Pred imunoanalýzou boli vzorky najskôr podrobené elektroforéze v 15% SDS-PAGE géloch a po prebehnutí prenesené na nitrocelulóзовú membránu (Hybond-ECL-Nitrocellulose, Amersham, Veľká Británia). Membrány boli blokované 10 mM TrisHCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,05% Tween obsahujúc 5 % sušené mlieko a inkubované s afinitne čistými anti-His protilátkami (Novagen). Imunodetekcia bola uskutočnená pomocou protilátok IgG HRP (Promega) nariadené v pomere 1:5000, podľa ECL protokolu (Amersham, Veľká Británia).

Stanovenie aktivity tioredoxínov

Na stanovenie aktivity tioredoxínov boli pri laboratórnej teplote uskutočnené nasledovné eseje:

Aktivácia špenátovej malátdehydrogenázy

Experiment sme uskutočnili podľa Scheibe a spol.¹⁴. Reakčná zmes (2 ml) obsahovala: 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 0,25 mM NADPH, extrakt zo špenátových chloroplastov (približne 85 µg proteínov) a príslušné množstvo TrxA2 alebo TrxA3 (približne 40 až 80 µg proteínov). Reakčná zmes bola inkubovaná 60 min pri laboratórnej teplote a štartovaná prídavkom kyseliny oxalacetovej (OAA) do výslednej koncentrácie 2 mM. Hladina oxidovaného NADPH bola sledovaná na spektrofotometri HITACHI U-2001 pri vlnovej dĺžke 340 nm počas



Obr. 2. Izolácia a imunodetekcia tioredoxínov *S. coelicolor*. A1, B1: SDS-PAGE (15% w/v) TrxA2 a TrxA3 *S. coelicolor* z nadproduktčných kmeňov *E. coli* BL21-*trxA2*, resp. *E. coli* BL21-*trxA3*. Dráha č. 1: Bunkový extrakt po sonikácii, 2. supernatant po ultracentrifugácii, 3. frakcia eluovaná po nanosení vzorky na kolónu, 4. frakcia eluovaná po nanosení nanášacieho tlmivého roztoku, 5. frakcia eluovaná po nanosení premývacieho pufru, 6.-10. frakcie eluované po nanosení elučného tlmivého roztoku s koncentraciami imidazolu 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,4 M a 1 M, 11. frakcia eluovaná po nanosení ukončovacieho tlmivého roztoku. (dráhy 10 a 11 v obrázku B1 sú vynechané). A2, B2: Western blot analýza, imunodetekcia vzoriek TrxA2 a TrxA3 separované SDS-PAGE elektroforézou boli naviazané na nitrocelulózovú membránu a blokované s anti-His protilátkami. Poradie nanosených vzoriek je paralelné s poradím vzoriek nanosených na elektroforézu

bolizmu, ktorého aktivita môže byť ovplyvnená hladinou aktívneho Trx, je NADP závislá MDH, avšak nie NAD závislá MDH, ktorá je aktívna v prostredí fyziologického pH. Tioeredoxín je schopný redukovať špecifické disulfidy, čím aktivuje MDH a tým sa aktívne miesto MDH stáva prístupným pre substrát oxalacetát¹⁸. Princípom stanovenia bolo sledovanie vplyvu Trx na aktivitu špenátovej MDH, pričom aktivita oboch bielkovín je závislá od koenzýmu NADPH. Aktivitu MDH sme stanovili v reakcii s OAA. Uvedeným experimentom sme potvrdili schopnosť tioredoxínov aktivovať chloroplastovú MDH zo špenátu. TrxA2 a TrxA3 majú vyššiu objemovú aktivitu ako TrxA (tab. II). Táto metóda je vhodná pre rýchle stanovenie aktivity tioredoxínov.

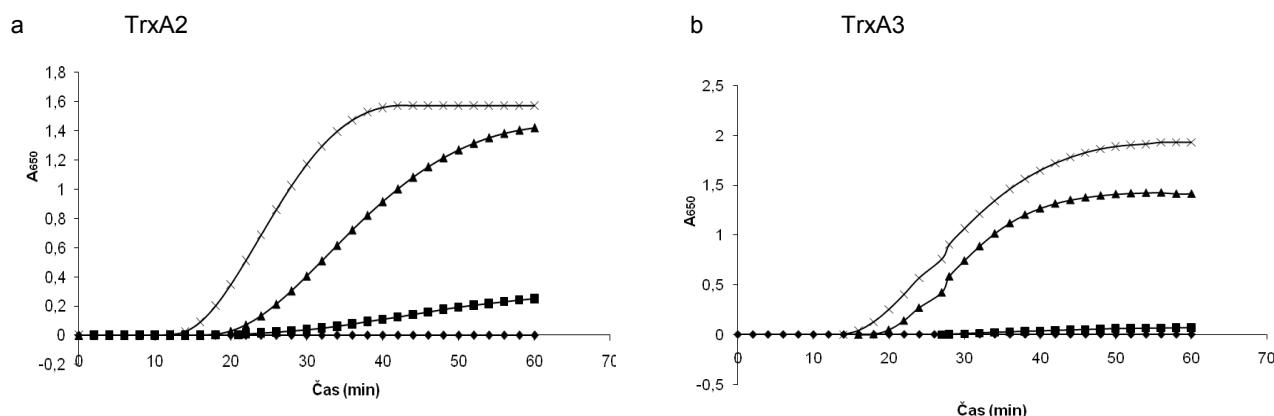
Všetky doteraz študované tioredoxíny katalyzovali redukcii inzulínu, preto sme sa rozhodli otestovať aj naše proteíny. Ak je tioredoxín aktívny (redukovaný) a schopný redukovať dve disulfidové väzby medzi inzulínovými vláknami A a B, dochádza k zakaleniu roztoku inzulínu v dôsledku precipitácie jeho jedného voľného vlákna. Zákal možno pozorovať v kyvete aj voľným okom. Intenzita zákalu v priebehu reakcie vzrastá, z tohto dôvodu možno reakciu sledovať spektrofotometricky. Použitím vyšších koncentrácií tioredoxínov sme dosiahli rýchlejší priebeh reakcie. Ako vidno na obr. 3, prídanie 8,4 μM tioredoxínov do reakcie spôsobuje výrazný nárast absorbancie, a to už po 20 min. V práci Štefanková a spol.¹⁰ bolo popísané, že k redukcii inzulínu v prítomnosti TrxA došlo už po cca 14 min, pričom krivka závislosti pre 16 μM TrxA bola

identická s 8 μM TrxA, čo potvrdzuje, že reakcia bola saturovaná už pri koncentrácii 8 μM TrxA. Meraním TrxA2 a TrxA3 s koncentraciou okolo 16 μM sme dosiahli podobný efekt saturovanej reakcie. Nižšie koncentrácie použitých tioredoxínov spôsobujú neskoršie objavenie zákalu a samozrejme aj pomalší priebeh redukcie disulfidových väzieb inzulínu. Ako vidieť na obr. 3, v kontrolnej reakcii bol zaznamenaný minimálny nárast absorbancie, a to až po 30 min od začiatku reakcie, ktorý sa už v ďalšom priebehu nemenil. Uskutočnenými experimentami sme potvrdili redoxnú aktivitu nadproduktovaných ďalších tioredoxínov *S. coelicolor*.

DTNB je vo všeobecnosti považovaná za vhodný disulfidový substrát, a preto je často využívaná v reakciách pre stanovenie aktivity tioredoxínreduktáz. Princípom re-

Tabuľka II
Aktivácia špenátovej malátdehydrogenázy (šMDH) pomocou tioredoxínov

Vzorka	Objemová aktivita [U ml^{-1}]	Δ	Aktivácia
šMDH	5,0	0	0
šMDH+TrxA	5,6	0,6	+
šMDH+TrxA2	6,5	1,5	+
šMDH+TrxA3	6,7	1,7	+



Obr. 3. Inzulín-reduktázová aktivita tioredoxínov TrxA2 a TrxA3 *S. coelicolor*. DTT závislá redukcia disulfidových väzieb inzulínu s rozličnými koncentraciami tioredoxínov. Ako kontrola bola uskutočnená redoxná reakcia inzulínu s DTT bez prítomnosti tioredoxínov. V reakciách boli sledované zmeny absorbancii v čase pri vlnovej dĺžke 650 nm. a) TrxA2: ♦ kontrola, ■ 2,8 μM TrxA2, ▲ 5,6 μM TrxA2, × 8,4 μM TrxA2; b) TrxA3: ♦ kontrola, ■ 2,8 μM TrxA3, ▲ 5,6 μM TrxA3, × 8,4 μM TrxA3

akcie je prenos elektrónov z NADPH na tioredoxín prostredníctvom aktívnej TrxR. Redukovný tioredoxín je potom reoxidovaný prostredníctvom DTNB, ktorá tu vstupuje ako konečný elektrónový akceptor a jedna molekula DTNB je štiepená na dve molekuly TNB. Takýto elektrónový transport je podstatou funkcie tioredoxínového systému vo väčšine organizmov, rovnako ako aj v *S. coelicolor* v prípade TrxA (cit.¹⁰). Aktivitu použitej TrxR sme potvrdili v reakcii s TrxA. Uskutočnili sme rad experimentov s identickou reakciou, kde sme namiesto TrxA použili ďalšie tioredoxíny *S. coelicolor* – TrxA2 a TrxA3. Ani v jednom prípade sme nezaznamenali pozitívny priebeh reakcie, t.j. zmeny absorbancie počas priebehu reakcie boli nulové. Podobné výsledky boli získané v reakciách, kde boli použité tioredoxíny Trx1 z *E. coli* a Trx1 zo *S. aureofaciens*^{10,19}. Uvedenými experimentami sa potvrdilo, že bakteriálne tioredoxínreduktázy sú vysokošpecifické enzýmy schopné redukovať len tioredoxín príslušného organizmu a nie sú schopné využívať disulfidové väzby iných proteínov^{20,21}. Keďže afinita TrxR je voči TrxA2 a TrxA3, nemerateľne nízka, predpokladáme, že tioredoxíny by mohli byť v *S. coelicolor* používané v inom systéme ako v tioredoxínovom, resp. uplatňujúce sa v inom mechanizme, ktorý zatiaľ nebol preštudovaný. Taktiež je možné že tieto proteíny exprimuje baktéria za špecifických rastových podmienok. Inou príčinou môže byť, že štruktúra týchto dvoch tioredoxínov sa mierne odlišuje od TrxA, vďaka čomu je afinita voči DTNB ako substrátu nižšia.

Záver

Podarilo sa nám pripraviť nadprodučné kmene a purifikovať ďalšie tioredoxíny (TrxA2 a TrxA3) pochá-

dajúce z bakteriálneho modelu *S. coelicolor* A3(2). Tioredoxíny TrxA2 a TrxA3 vykazujú aktivitu pri štandardne používaných biochemických metódach – pri aktivácii špenátovej malátdehydrogenázy a tiež v reakcii s inzulínom.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu BIOMAKRO1 ITMS:26240120003, BIOMAKRO2 ITMS:26240120027 na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu VEGA 1/0371/09.

LITERATÚRA

- Holmgren A.: Annu. Rev. Biochem. 54, 237 (1985).
- Newton G. L., Arnold K., Price M. S., Sherrill C., Delcardayre S. B., Aharonowitz Y., Cohen G., Davies J., Fahey R. C., Davis C.: J. Bacteriol. 178, 1990 (1996).
- Holmgren A.: Structure 3, 239 (1995).
- Euklund H., Gleason F. K., Holmgren A.: Proteins 11, 13 (1991).
- Holmgren A., Kallis G. B., Nordstrom B.: J. Biol. Chem. 256, 3118 (1981).
- Holmgren A.: Biofactors 11, 63 (2000).
- Paget M. S. B., Kang J. G., Roe J. H., Buttner M. J.: EMBO J. 17, 5776 (1998).
- Vohradsky J., Li X.-M., Dale G., Folcher M., Nguyen L., Viollier P. H., Thompson C. J.: J. Bacteriol. 182, 4979 (2000).
- Paget M. S. B., Hong H.-J., Bibb M. J., Buttner M. J., v: SGM symposium 61: Signals, switches, regulons and cascades: control of bacterial gene expression (Hodgson D. A., Thomas C. M., ed.). Cambridge University Press, Cambridge 2002.

10. Štefanková P., Perečko D., Barák I., Kollárová M.: *J. Basic Microbiol.* 46, 47 (2006).
11. Hopwood D. A., Bibb M. J., Chater K. F., Kieser T., Bruton C. J., Kieser H. M., Lydiate D. J., Smith C. P., Ward J. M., Schrempf H.: *Genetic Manipulation of Streptomyces - A Laboratory Manual*. John Innes Institute, Norwich 1985.
12. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. O., Seidmann J. S., Smith J. A., Struhl K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York 1987.
13. Bradford M. M.: *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976).
14. Scheibe R.: *Physiol. Plant* 71, 393 (1987).
15. Holmgren A.: *J. Biol. Chem.* 254, 9113 (1979).
16. Luthman M., Holmgren A.: *Biochemistry* 21, 6628 (1982).
17. Gleason F. K., Holmgren A.: *FEMS Microbiol. Rev.* 271 (1988).
18. Krimm I., Goyer A., Issakidis-Bourguet E., Miginiac-Maslow M., Lancelin J. M. J.: *Biol. Chem.* 274, 34539 (1999).
19. Horecká T., Perečko D., Kutejová E., Muchová K., Kollárová M.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40, 497 (1996).
20. Holmgren A.: *J. Biol. Chem.* 264, 13963 (1989).
21. Becker K., Gromer S., Schirmer R. H., Müller S.: *Eur. J. Biochem.* 267, 6118 (2000).

M. Koháryová^a, I. Barák^b, and M. Kollárová^a
(^a *Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University, Bratislava,* ^b *Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Expression and Purification of Thioredoxin 2 and Thioredoxin 3 from *Streptomyces coelicolor* A3 (2)**

The thioredoxin system is a significant redox regulator in all organisms. Thioredoxins in bacteria are the major dithiol reductants in the cytosol (or an advanced equivalent to dithiotreitol of cells) thanks to the low redox potentials (Holmgren, 1985). In the genome of the studied model *Streptomyces coelicolor* A3(2) several genes were revealed which code proteins forming the thioredoxin system. It seems that this gram-positive soil bacteria have a very complex redox system, with a variety of reducing possibilities. In this work cloning, purification and characterization of further thioredoxins (TrxA2 and TrxA3) are described. Both proteins were overexpressed in *E. coli* cytoplasm as soluble active hexahistidine fusion proteins and isolated as homogenous substances.