

Az S100A4/metasztazin és a p53 kölcshatásának szerkezeti vizsgálata

XXXI. OTDK Biológia Szekció
Biológus Msc

Készítette:
Ecsédi Péter

Témavezető:
Dr. Nyitrai László, vezető kutató, tanszékvezető
Kiss Bence, PhD hallgató
Biokémiai Tanszék

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet

Budapest, 2013

Tartalom

Bevezetés	3
Célkitűzések	6
Anyag és módszer	7
A p53 TAD fragmentumok előállítása	7
Fluoreszcencia polarizációs (FP) mérés	9
Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	10
Izotermális titráló kalorimetria (ITC)	10
Eredmények és értékelésük	10
TAD fragmentumok vizsgálata FP módszerrel	10
Az S100A4 - p53 TAD interakció jellemzése ITC módszerrel	12
TAD és S100A4 kölcsönhatás szerkezeti jellemzése CD spektroszkópiával	12
Konklúzió	14
Összefoglaló	16
Summary	17
Irodalomjegyzék	18
Köszönetnyilvánítás	20
Szerzői hozzájárulás és nyilatkozat	21

Bevezetés

A p53 a sejtciklus szabályozása mellett fontos tumor szupresszor fehérjeként kritikus szerepet tölt be a többsejtű élőlények életében. DNS károsodás során képes beindítani a javító mechanizmusokat, leállítani a sejtciklust és szükség esetén apoptózisra kényszeríteni a sejtet. Fontosságát mutatja, hogy daganatos elváltozások felénél a p53 mutációja figyelhető meg [1-3]. Sokrétű feladatát az N-terminálison elhelyezkedő transzaktivációs doménhez (TAD) kapcsolódó számos szabályozó fehérje és koaktivátor közreműködésével végzi. A domént két eltérő funkcióval rendelkező szubdomén (TAD1 és TAD2) alkotja [4]. Míg a TAD1 az apoptózis szignált közvetítő fehérjék expresszióját befolyásolja, addig hiányában a TAD2 magában csak tumor szupressziós mechanizmusokat képes indukálni, sejtpusztulást nem [5]. A TAD-ot egy prolinban gazdag domén (PRR) követi, majd az ismert és sokat vizsgált DNS-kötő domén (DBD) helyezkedik el. Ennek mutációja megakadályozza a p53 kötődését a DNS-hez, így az képtelen lesz transzkripciós faktorként működni és serkenteni, illetve gátolni egyes gének aktivitását [6]. A C-terminális felé helyezkedik el az úgynevezett tetramerizációs domén (TET) és a negatív regulációs domén (NRD), amelyek a hatékonyabb működésre képes tetramer kialakításában, illetve a fehérje negatív szabályozásában játszanak szerepet [4, 7, 8] (1. ábra).



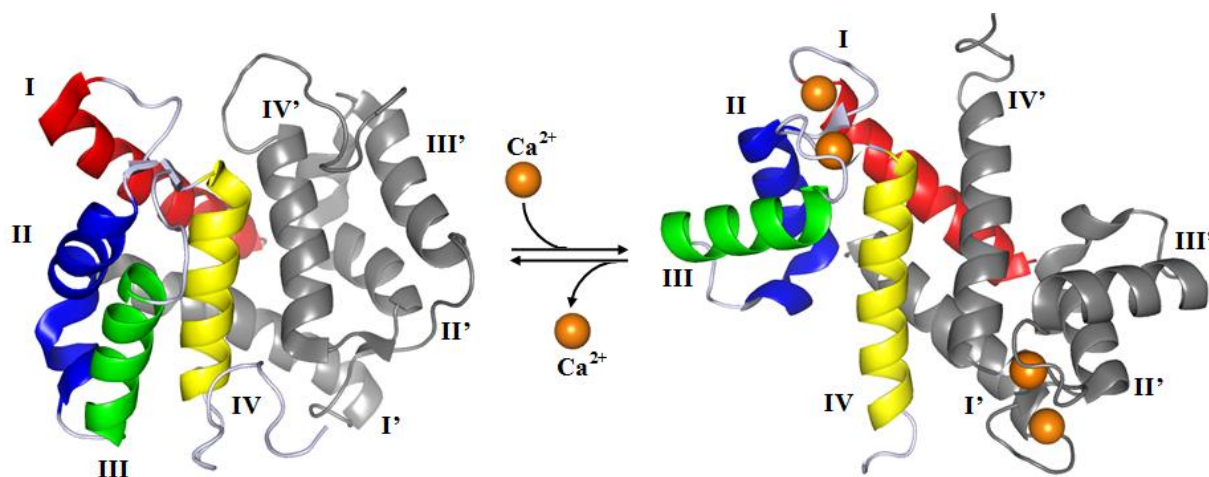
1. ábra. A p53 szerkezeti felépítése [4].

Nyugalmi állapotban az MDM2 ubiquitin ligáz a legfontosabb szereplője a p53 sejtben belüli koncentrációjának szabályozásában. TAD-hoz kötődve elősegíti a p53 transzportját a sejtmagból a sejtplazmába, ahol ubiquitinálja azt. Ez a lebontási szignál a proteasóma számára, amely ezután képes degradálni a p53-at [9]. DNS károsodás, oxidatív stressz vagy ozmotikus sokk hatására az N-terminális egyes aminosavai foszforilálódnak, ami során a p53 stabilabbá válik, és fél életideje lecsökken. A folyamat legfontosabb lépése a 18. pozícióban lévő treonin foszforilációja lehet, mivel ekkor az MDM2 affinitása lecsökken ($K_d \approx 0,2 \mu\text{M}$ -ról $K_d \approx 5,2 \mu\text{M}$ -ra) [10, 11], így a transzkripciós koaktivátorok, mint a p300 vagy a PCAF ezt követően már képesek lesznek a transzaktivációs doménhez kötődve aktiválni a p53-at.

A TAD partnerei közé sorolhatóak az úgynevezett S100 család egyes tagjai, többek között az S100A1, S100A2, S100A6, S100B és az általunk is vizsgált S100A4 fehérjék [4]. Kölcsönhatásuk szabályozásban betöltött szerepe még nem teljesen ismert.

Az S100A4/metasztazin evolúciós szempontból a legfiatalabb, csak gerincesekben előforduló, EF-kéz Ca^{2+} -t kötő fehérjecsalád egyik legérdekesebb tagja. Az S100 elnevezés onnan származik, hogy telített ammónium-szulfát oldatnál is oldatban maradnak, nem szóthatók ki. A család tagjai, így az S100A4 is kettő, a kalcium-ion megkötésére alkalmas EF-kéz motívummal rendelkezik. Míg a C-terminálison egy kanonikus forma, hasonlóan a kalmodulinéhoz, erősen képes a Ca^{2+} megkötésére ($K_d = 2,6 \mu\text{M}$), addig az N-terminálison, egy gyengébb affinitással rendelkező úgynevezett „pseudo” vagy ál-EF-kéz motívum helyezkedik el [12, 13]. Az S100 fehérjékhez hasonlóan az S100A4 is jellemzően homodimereket képez, melyet a két alegység két-két hélixéből (I-IV és I'-IV') (2. ábra) felépülő X-típusú négy-hélix köteg másodlagos kötésekkel stabilizál [12, 14, 15].

A Ca^{2+} kötődésekor egy nyitottabb konformáció alakul ki, miközben a III-as hélix mintegy 40° -kal elfordul. A változás során felszínre kerülnek az addig rejtett hidrofób aminosavak, melyek segíthetik az interakciók létrejöttét (2. ábra). Az egyes S100 fehérjék specifikusan jellemzőek a különböző szövetekre, de akár sejt részekre is.



2. ábra. Az S100 fehérjék konformáció változásának szerkezeti sémája Ca^{2+} kötését követően. A dimer egyik alegysége szürkével, másik színesen van ábrázolva. A harmadik hélix mintegy 40° -al történő elfordulása során felszínre kerülő hidrofób aminosavak alakítják ki a kötőfelszínt [16].

Már régebb óta ismert, hogy az S100A4 megemelkedett szintje és az agresszívabb, könnyebben áttétet képző tumorok között összefüggés van. Első és második stádiumban lévő tüdőrákos betegeknél Rudland és munkatársai készítettek egy felmérést, amihez két csoportot alakítottak ki az alapján, hogy az S100A4 fehérje koncentrációja a normál érték felett volt vagy sem. Az S100A4-pozitív betegek átlagosan mintegy 10 évvel korábban hunytak el, mint a negatívok [3]. Ha figyelembe vesszük, hogy az S100A4 képes kapcsolatot teremteni sok más fehérje mellett a nem-izom miozin IIA-val (NMIIA) [14, 15], a p53-mal [17, 18] és az annexin A2-vel [19] is, akkor ezeket vizsgálva talán magyarázatot kaphatunk erre az összefüggésre. Kutatócsoportunk feltérképezte az NMIIA-val történő kölcsönhatás részleteit.

Az S100A4 kötődésének hatására drasztikus változások mennek végbe az NMIIA filamentum képződéséért felelős C-terminuson, melyek a filamentumok széteséséhez, végül a sejtek motilitásának növekedéséhez vezetnek [14]. Egy másik kutatócsoport emellett azt találta, hogy az S100A4 funkcióvesztett (KO) egereknél a makrofágok elveszítették a célzott mozgás képességét, és csak random helyváltozást tudtak végezni [20].

A p53 és az S100A4 kölcsönhatásával kapcsolatban az irodalmi adatok egymásnak ellentmondó eredményeket mutatnak. Abban megegyeznek, hogy az S100A4 más S100 fehérjékkel hasonlóan képes a TET doménhez kötődni ($K_d \approx 17 \mu\text{M}$ az S100A4 esetében) [21]. A kapcsolat inkább csak a p53 monomer formájával figyelhető meg, ezzel akadályozva a p53 tetramerizációját. A folyamat sejtre kifejtett hatása nem igazán tisztázott, mivel a p53 tetramerként sokkal hatékonyabban képes a transzkripciót szabályozni, viszont monomer állapotban könnyebben transzportálódik a sejtmagba. Ennek ellenére az S100A4 a TET-hez való kötődéssel inkább gátló hatást válthat ki, mert az MDM2 is elsősorban a sejtmagban kötődik a p53-hoz, és így degradációja fokozódhat [22, 23].

Az S100A4 és a transzaktivációs domén kapcsolata és hatása is részben ismeretlen előttünk. A TAD felelős az apoptózis és a tumor szuppresszió indukálásáért. Ezzel kapcsolatban érdekes összefüggést figyelt meg egy kutatócsoport, miszerint a különféle daganatos sejtvonalakban az S100A4 megemelkedett koncentrációja az esetek túlnyomó részében csak akkor alakulhatott ki, ha a p53 DNS kötő doménje egy mutáció folytán képtelen volt a DNS-hez kötődni, vagy a fehérje egyáltalán nem expresszáldott a sejtből. Ez fordítva is igaz volt, mivel megemelkedett koncentrációjú vad típusú p53 mellett nem találtak S100A4-et [10]. Ami még érdekesebb, hogy apoptózist figyeltek meg akkor, ha transzfektálással pótolták a hiányzó fehérjét [10, 17, 18]. Ezek alapján elmondható, hogy az S100A4 a p53 aktivitását módosítani képes úgy, hogy a sejtpusztulás kialakulását segíti. A folyamat kulcsa a TAD és az S100A4 interakciója lehet. Felmerül a kérdés, hogy ha az S100A4 a tumor sejteket az apoptózis felé tereli, akkor miért figyelhető meg kapcsolat a kialakuló metasztatizáció és közte? Egy atomi felbontású szerkezet tisztázhatná a fentebb ismertetett ellentmondásokat is amellett, hogy később esetleg beépülhetne a jövőbeli rákkutatásokba és ezzel talán segítve egy tumorellenes gyógyszer mihamarabbi kifejlesztését.

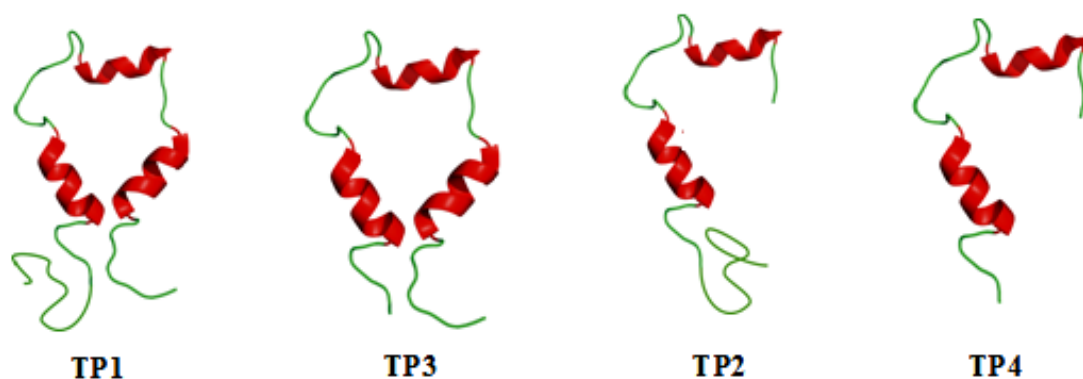
Célkitűzések

Munkám során elsősorban a TAD – S100A4 kölcsönhatásának szerkezeti jellemzését végeztem abból a célból, hogy a két fehérje általi szabályozó mechanizmusok érthetőbbé váljanak számunkra. Mivel az eddigi kutatások a TAD kötőhelyet csupán egy 60 aminosav hosszú régióra tudták leszűkíteni, elsőként a "minimális" kötőhely feltérképezését tűztem ki célul. Ennek meghatározása után az interakció szerkezeti vonatkozásait vizsgáltam, úgymint a kötés sztöchiometriája és a TAD másodlagos szerkezetének változása az S100A4-gyel történő kölcsönhatása során. Módszertani megközelítésként fluoreszcencia polarizációs, izotermális titráló kalorimetriás (ITC) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás mérésekkel vizsgáltam a komplex kialakulását. A TAD S100A4 kötő régiójának pontos leírása, valamint a kölcsönhatás affinitásának és sztöchiometriájának meghatározása nyomán, a komplex atomi felbontású szerkezetének megismerése a célom, melynek érdekében megkezdtem az S100A4 – TAD komplex kristályosítását.

Anyag és módszer

A p53 TAD fragmentumok előállítása

A humán p53 (Uniprot:P04637) transzaktivációs doménjét négy egymással átfedő fragmentumra osztottam, amelyek a TP1 (1-60. aminosav pozíció), TP2 (1-45.), TP3 (11-60.) és TP4 (11-45.) elnevezést kapták (3. ábra). A fragmentumokat polimeráz láncreakcióval (PCR) állítottam elő a vad típusú teljes hosszúságú p53 szekvenciából (a p53-at kódoló rekombináns DNS az ADDgene plazmid repozitóriumból származik). A PCR során KOD⁺ DNS-polimerázt használtam (Novagen). A primerek magas GC-tartalma miatt választottam ezt az enzimet, ezzel növekedett az amplifikálás hatásfoka a korábban használt DNS polimerázokhoz képest. A PCR során 2% dimetil-szulfoxid-ot (DMSO) is alkalmaztam, ezzel is javítva a hatásfokot. Az annealációs hőmérsékletet a reakció számára legoptimálisabbnak meghatározott 65°C-ra állítottam.



3. ábra Az előállított TAD fragmentumok sematikus ábrája a PDB: 2L14 NMR szerkezet alapján.

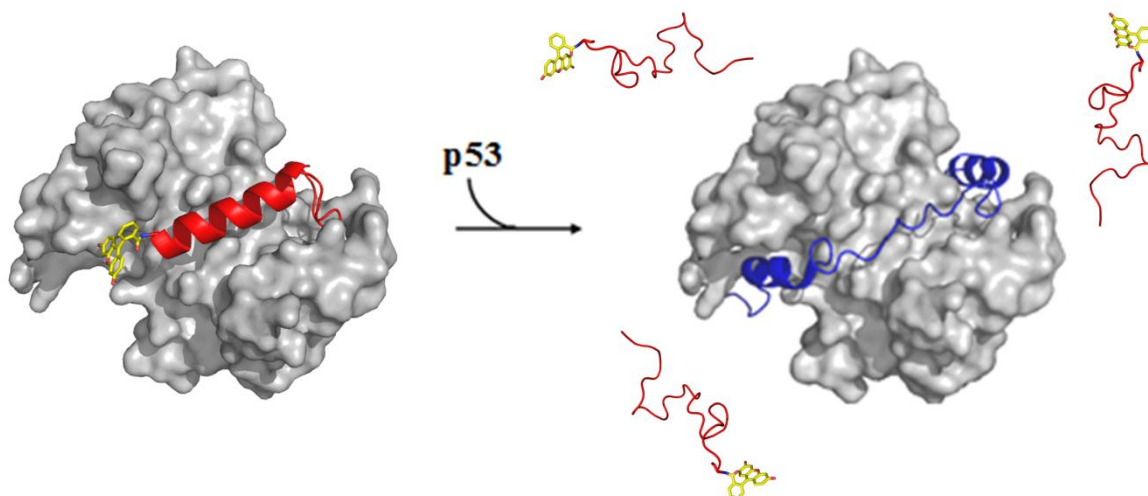
A szekvenciákat *Bam*HI-el és *Xho*I-el emésztve pETARA vektorba építettem be glutation s-transzferáz (GST) fúziós fehérjét kódoló szekvencia mögé. A ligálást T4 DNS ligáz enzimmal (Fermentas) végeztem, majd 1 óra szobahőmérsékleten és 15 perc 4 °C-on történő indukálást követően a ligátumot DH5α (New England Biolabs) klónozó sejtekbe transzformáltam, és 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-agaróz lemezen szelektáltam. A sejteket egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem, majd PCR-rel ellenőriztem, hogy a peptideket kódoló inszert megfelelően beépült-e a vektorba. Ehhez egy a vektorra, és egy az inszertre specifikus primert használtam. A pozitív telepekből 3ml LB tápoldatban 37 °C-on felnövesztett sejtekből plazmidot izoláltam DNS izoláló kit segítségével (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit). A GST-fúziós peptidek expressziója Rosetta (Novagen) sejtekben történt LB tápoldatban 100 µg/ml ampicillin mellett. Az indukció 0,5-0,8 közötti optikai denzitás (OD) értéken 500 µM Izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG)

hozzáadásával 25 °C-on 4 órán keresztül történt. Az indukció végeztével 5 percig 3130 x g-vel fugáltam a sejteket, majd 20mM NaH₂PO₄ pH 7,4, 150 mM NaCl tartalmú pufferben vettem fel őket 0,2 mg/ml PMSF szerin proteáz inhibitor jelenlétében. Lizozim hozzáadásával és fagyasztással segítettam a sejtfal lebontását. Végző lépésként a sejteket ultrahangos roncsolással feltártam. Fugálással eltávolítottam a sejttörmelékét (4 °C, 33987 x g). A fragmentumok tisztításához GST-Sepharose oszlopot használtam. A mintákat oszlopra töltésük után legalább ötszörös oszloptérfogatnyi pufferrel mostam, és 10 mM glutationt tartalmazó elúciós oldattal eluáltam. A GST fúziós partnert Tobacco Etch Virus (TEV) proteázzal távolítottam el a rekombináns peptidekről (3-4 óra szobahőmérsékleten), majd hődenaturációt követően centrifugálással távolítottam el. A felülúszót tovább tisztítottam reverz fázisú nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (RP-HPLC) Jupiter 300 C18 oszlopot (Phenomenex) használva. A peptidek elúcióját víz – acetonitril grádienssel végeztem, a p53 fragmentumok 45-48%-os acetonitril aránynál eluálódtak. A tisztított fragmentumokat a liofilizálást követően -70°C-on tároltam. A tisztított peptidek molekulatömegét tömegspektrometriával ellenőriztük.

A humán vad típusú S100A4 (Uniprot:P26447) klónozását a laboratóriumban korábban már elvégezték. A fehérjét BL21-Star (Invitrogen) sejtekben expresszáltattam. Az expressziót LB tápoldatban 100 µg/ml ampicillin mellett végeztem. Az indukció 0,5-0,8 OD érték mellett történt 500 µM IPTG-vel, 37°C-on 3 órán keresztül. Ezt követően a centrifugált sejteket 50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl és 0.1 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) redukálószer tartalmú oldatban vettem fel és a p53 peptidekhez hasonló módon végeztem a feltárást. A fehérje tisztítása Ni²⁺-affinitás kromatográfiával történt (Bio-Rad). 20 mM HEPES-t, 25 mM NaCl-ot és 250 mM imidazolt tartalmazó pufferrel eluáltam. Vigyázva, hogy az elúciós pufferbe ne legyen foszfát, mivel az a CaCl₂ hozzáadásakor kicsapódna. A His₆-tag-et TEV proteázzal történő emésztéssel távolítottam el (3-4 óra alatt szobahőmérsékleten). A teljesen hasítódott fehérjét Phenyl-Sepharose (Amersham Biosciences) oszlopra vittem fel 1 mM CaCl₂ jelenlétében alacsony ionerő (20 mM NaCl) mellett. Az elúciót 5 mM EGTA tartalmú pufferrel végeztem. A fehérjét 20 mM HEPES pH 7,5, 20 mM NaCl, és 0,2 mM TCEP összetételű pufferben dializáltam. Végül Amicon Ultra centrifuga szűrőt használva 2-4 mM töménységűre koncentráltam a mintákat. Ekvimoláris mennyiségű TCEP hozzáadása után -70°C-on tároltam őket.

Fluoreszcencia polarizációs (FP) mérés

Az N-terminálisán karboxi-fluoresceinnel konjugált NMIIA peptidet (Fluo-NMIIA) és a p53 konstrukciókat 20 mM HEPES pH 7,5, 1 mM CaCl_2 , 0,1 mM TCEP, és 0,05% Brij-35 detergens tartalmú pufferben oldottam fel. Első lépésként direkt titrálással meghatároztam a Fluo-NMIIA és az S100A4 kölcsönhatásának disszociációs állandóját, ami során 50 nM Fluo-NMIIA peptidet titráltam S100A4 dimerrel. A fluoreszcencia polarizáció akkor minimális, ha a fluoresceinnel konjugált peptid szabad állapotban van. A polarizáció értéke akkor éri el a maximumot, amikor a jelölt peptid 100%-a S100A4-gyel komplexben található.



4. ábra A kompetitív fluoreszcencia polarizációs mérés sémája. Kompetitor p53 peptid hatására az S100A4 – Fluo-NMIIA komplex disszociál, és alacsonyabb polarizációs értéket kapunk. Az ábra Pymol program segítségével készült az NMIIA-val kapcsolatos ismereteink alapján [14].

A mért disszociációs állandó felhasználásával meghatároztam azt az S100A4 koncentrációt, ami 70%-ban telíti a Fluo-NMIIA peptidet. Így a 30 μM monomer S100A4-et és 50 nM jelölt miozin fragmentumot tartalmazó oldatot titráltam a TAD peptidekkel. Mind a négy kompetitív titrálás esetében 100 μM -os TAD koncentrációból kiindulva, kétharmadoló hígítással haladva 13 pontban mértem. Ha a jelölt NMIIA peptid és a TAD fragmentumok versengenek egymással az S100A4 kötőhelyekért, csökkenő polarizációs értékeket kapunk, mivel a Fluo-NMIIA szabad állapotba kerül, rotációja felgyorsul (4. ábra). A méréseket 37°C-on végeztem, 480 nm-en gerjesztve és 525 nm-en mérve az emissziót egy BioTek Synergy multifunkciós lemezleolvasó készülékkel. A direkt titrálást követően a mért adatokra a kutatócsoportomban már korábban használt összefüggés alapján illesztettem [14]. A kompetitív titrálás esetében a Wang-által leírt egyenlet módosított formáját alkalmaztam [24] az adatok kiértékelésére.

Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A mérést 10 mM HEPES pH 7,5, 20 mM NaCl, 1mM CaCl₂, és 1mM TCEP tartalmú pufferben végeztem, 27°C-on, 0,01 cm vastagságú kvarc küvettát használva, Jasco J 820 CD spektrofotométerrel. Két párhuzamossal meghatároztam a TP3 (50 µM), az S100A4 (160 µM) és a komplex távoli UV CD spektrumát (250-190 nm). Az S100A4-kötött p53 spektruma a komplex és az S100A4 spektrumának különbségeként áll elő, feltételezve, hogy az S100A4 másodlagos szerkezete nem változik a peptid ligandum kötődésének hatására [14]. A p53 peptid CD spektrumainak dekonvolúcióját a Dr. Kardos József és Mocsonai András által fejlesztett BestSel programmal végeztem (bestsel.elte.hu, publikálás alatt).

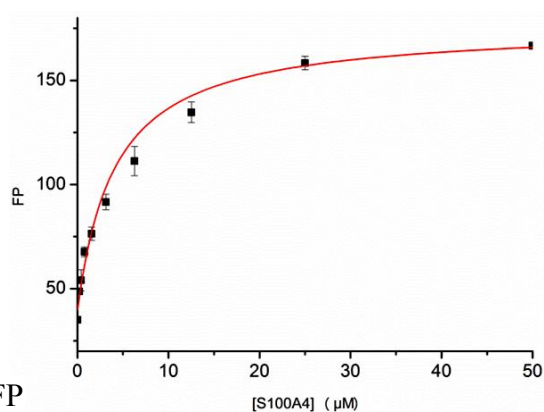
Izotermális titráló kalorimetria (ITC)

A mérés során 60 µM S100A4-et titráltam 500 µM töménységű TP3 fragmentummal, 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ és 0,5 mM TCEP tartalmú pufferben 37°C-on. Az injektálások között 400 másodpercet vártam. A mérést MicroCal VP-ITC készülékkel végeztem. Az adatok elemzését az OriginLab szoftvercsomag ITC-re fejlesztett Origin 5.0 programmal végeztem és a „One Set of Sites” modellel illesztettem.

Eredmények és értékelésük

TAD fragmentumok vizsgálata FP módszerrel

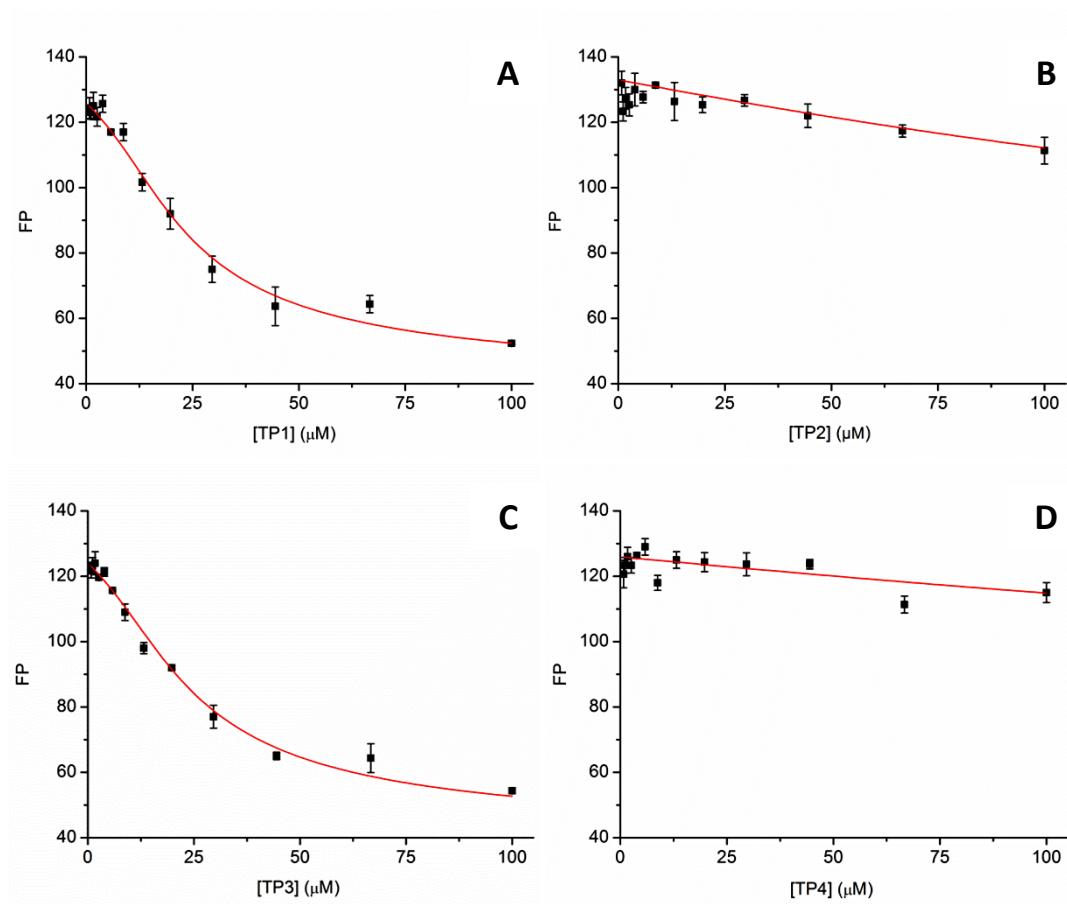
Az irodalomban egymásnak ellentmondó adatok találhatók az S100A4 és a p53 TAD-ja között létrejövő kölcsönhatás erősségéről. Egyes esetekben nem tudtak kimutatni interakciót [10], más esetben erős kölcsönhatást találtak [23]. Az S100A4 kötőhely pontos azonosítása céljából különböző p53 TAD fragmentumokat állítottam elő (3. ábra), melyek affinitását kompetitív FP módszerrel állapítottam meg. Először meghatároztam direkt titrálással az S100A4 és a



5. ábra. A Fluo-NMIIA peptid direkt titrálása S100A4-gyel ($K_d = 4 \pm 0.73 \mu\text{M}$).

Fluo-NMIIA disszociációs állandóját ($K_d = 4 \pm 0,73 \mu\text{M}$) (5. ábra). Ezután a Fluo-NMIIA – S100A4 komplexet titráltam a különböző TAD peptidekkel. Ha a kompetitor peptid a

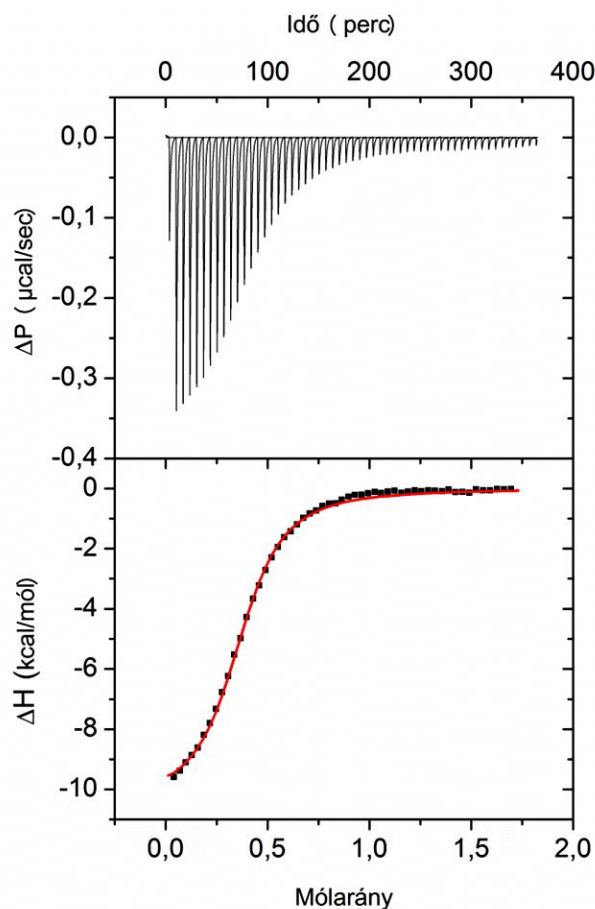
fluoreszcinnel konjugált peptidet leszorítja, akkor utóbbi forgási sebessége felgyorsul, a fluoreszcens polarizáció lecsökken. A TP1 (1-60.) és a TP3 (11-60.) esetében erős kompetíciót tapasztaltam ($K_d = 3,72 \pm 0,18 \mu\text{M}$, illetve $K_d = 4 \pm 0,25 \mu\text{M}$), míg a TP2 és TP4 esetében sokkal gyengébb kölcsönhatást figyeltem meg ($K_d = 160 \pm 62 \mu\text{M}$, $K_d = 60 \pm 14 \mu\text{M}$). A TP1 és a TP3 fragmentumok esetében azonos affinitás értéket kaptam, így elmondható, hogy a TAD N-terminális 11 aminosava nem vesz részt a kötésben (6. ábra). Kiderült, hogy a TAD1 kiterjesztése a TAD1 – TAD2 közötti szakasz hozzáadásával nem növelte az irodalomban közölt affinitás értéket [4]. A TAD2 jelenléte tehát szükséges a megfelelő kötés kialakításához. Mivel sikerült leszűkítenem az S100A4 kötőhelyet a további méréseket csak a kötőfelszín legszűkebben tartalmazó TP3 (11-60.) peptiddel végeztem.



6. ábra. Kompetitív fluoreszcencia polarizációs mérés a TAD fragmentumok és az S100A4 kölcsönhatásában. A TP1 ($K_d = 3,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$) (A) és a TP3 ($K_d = 4 \pm 0,3 \mu\text{M}$) (C) peptidek teljesen leszorították az S100A4-hez kapcsolódó jelölt NMIIA fragmentumot, esetükben az FP érték a minimum értékig esett. A TP2 ($K_d = 160 \pm 62,5 \mu\text{M}$) (B) és a TP4 ($K_d = 60 \pm 14,5 \mu\text{M}$) (D) ezzel szemben csak egy sokkal gyengébb kölcsönhatást alakítottak ki az S100A4-gyel.

Az S100A4 - p53 TAD interakció jellemzése ITC módszerrel

A szűkített kötőhely meghatározása után direkt módon vizsgáltam az S100A4 és a TP3 interakcióját. Ehhez az ITC módszert választottam, mivel ezzel a kölcsönhatások termodinamikai paramétereit is meghatározhatók. Közvetlenül mérhetjük a kötés affinitását (K_a), az entalpiaváltozást (ΔH) és a kötés sztöchiometriáját (n). Az előbbi két adatból kiszámítható a szabad-energiaváltozás (ΔG) és az entrópiaváltozás (ΔS) is a $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$ egyenlet alapján. Itt az FP mérésel jól egyező affinitást kaptam ($K_d = 2,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$) (7. ábra). A kötés sztöchiometriája ($n = 0,37 \pm 0,2$) alapján valószínűsíthető, hogy egy TAD peptid kötődik a dimer S100A4-hez. Ez megegyezik a már korábban vizsgált NMIIA – S100A4 komplex sztöchiometriájával [14]. Mivel az interakció entrópiaváltozása és entalpiaváltozása is negatív ($\Delta S = -7,77$, $\Delta H = -10,46 \pm 0,08 \text{ kcal/mól}$), így elmondható, hogy az S100A4 – TAD kölcsönhatás 37°C-on entalpia vezérelt folyamat.

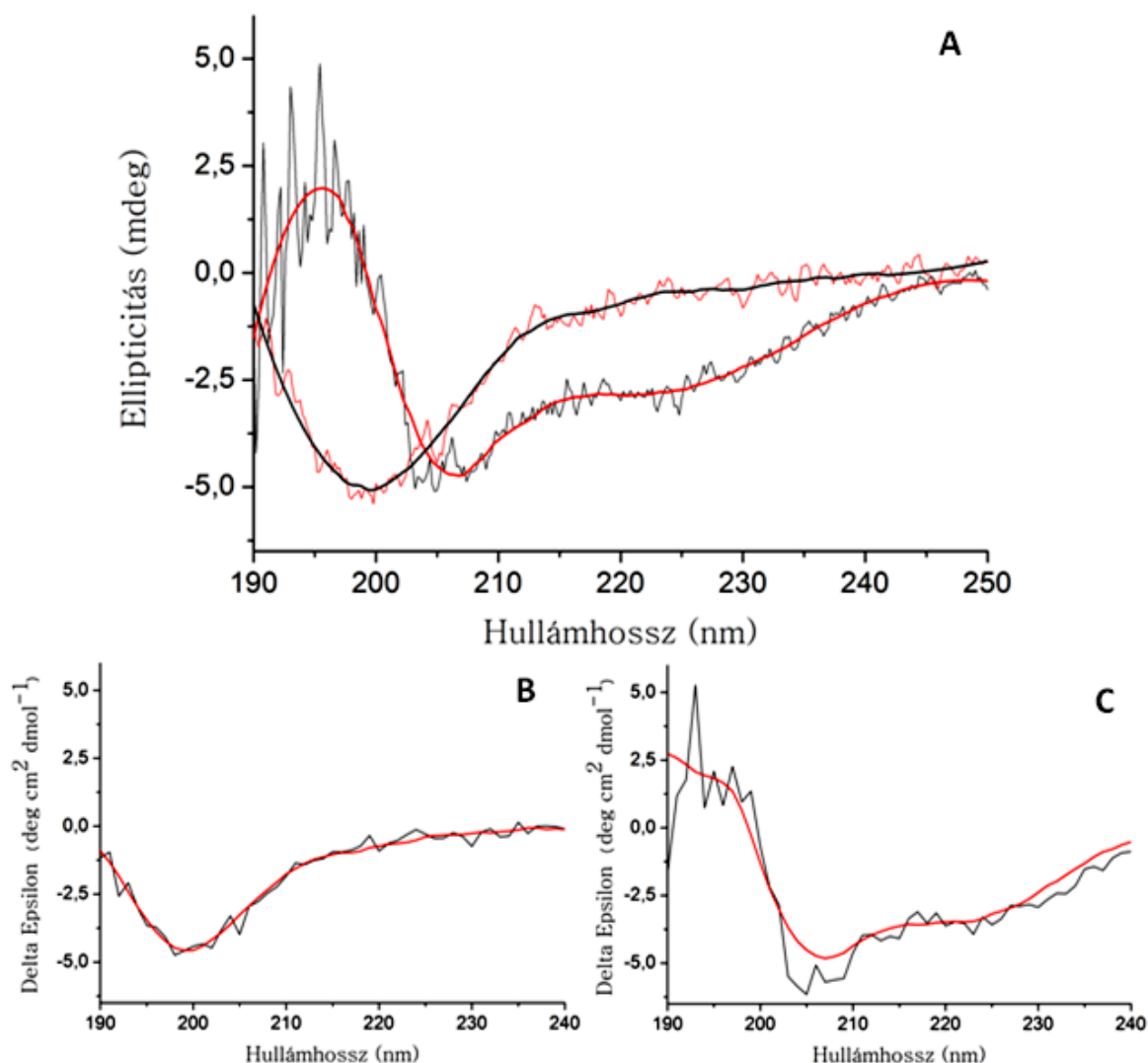


7. ábra. Az ITC mérés adatai felül és a csúcsok integráltjaira illesztett görbe alul. A TP3 és az S100A4 komplex sztöchiometriáját ($n=0,38 \pm 0,02$) és disszociációs állandóját állapítottuk meg ($K_d=2,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$).

TAD és S100A4 kölcsönhatás szerkezeti jellemzése CD spektroszkópiával

Annak vizsgálata céljából, hogy az eredendően rendezetlen szerkezetű TAD másodlagos szerkezete milyen módon változik az S100A4 kötés hatására, CD spektroszkópiás méréseket végeztem. A kölcsönhatás során a másodlagos szerkezetben bekövetkező változásokat vizsgáltam a TP3 peptid esetében. Az ismert K_d értéket felhasználva olyan koncentrációban adtam S100A4-et, hogy a TP3 peptid túlnyomó része (95%) kötött állapotban legyen. Ennek eléréséhez $160 \mu\text{M}$ S100A4-et adtam $50 \mu\text{M}$ TP3 peptidhez. A mérés során megvizsgáltam nemcsak a komplex, de a szabad S100A4 és TP3 peptid spektrumát is. Feltételezve, hogy komplexben nem változik az S100A4 szerkezete, a

komplexből kivonva a szabad S100A4 spektrumot megkapjuk a kötésben lévő TP3 szerkezetének a spektrumát. A szabad és a komplexben lévő TP3 állapotok spektrumainak dekonvolúciójával és összehasonlításával a másodlagos szerkezetben bekövetkező változásokat vizsgálhatjuk meg. Jelentős, mintegy 30%-os α -hélix tartalombeli növekedést figyeltünk meg az S100A4 kötés hatására (8. ábra, 1. táblázat). Ez azt jelenti, hogy az 51 aminosavból körülbelül 15 α -hélixet alakított ki. Érdekes megjegyezni, hogy a TAD másodlagos szerkezetét hasonló hélixtartalom jellemzi a CREB kötő fehérjével képzett komplexében (PDB: 2L14) [25].



8. ábra A TP3 peptid másodlagos szerkezetének vizsgálata CD spektroszkópiával. (A) Az S100A4-hez kötött p53 peptid (fekete mért, piros simítási görbe) hélix tartalma nagyobb, mint a főleg rendezetlen szerkezetű nem kötött formának (piros mért, fekete simítási görbe). A másodlagos szerkezeti elemek arányának meghatározása a szabad (B) és kötött peptid (C) spektrumának dekonvolúciójával történt a Bestsel program használatával. A mért (fekete) és dekonvolált (piros) spektrumokat a program 1 nm-enként ábrázolja.

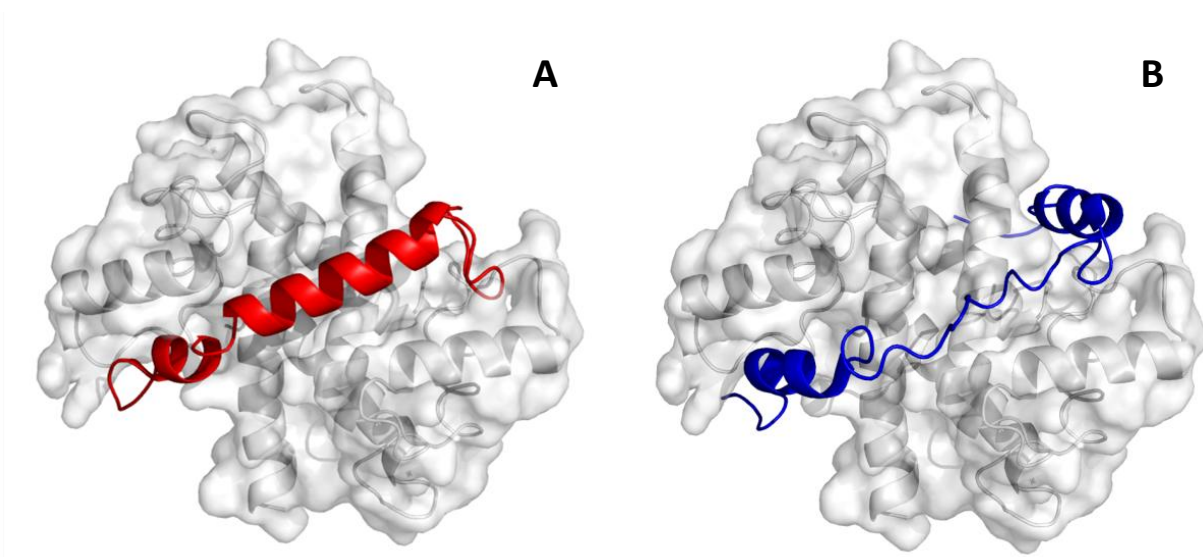
Konklúzió

Munkám fontos részét képezte az interakció feltérképezése mellett a p53 TAD – S100A4 és az NMIIA – S100A4 kölcsönhatások együttes értékelése, összehasonlítása. Az FP mérések bizonyították, hogy a p53 TAD verseng az NMIIA-val az S100A4-hez való kötődésért, tehát azonos helyre kötődnek az S100A4 dimeren. Mindkét partnerről elmondható, hogy más S100 fehérjék

komplex szerkezeteiben látható target peptideknél jelentősen kiterjedtebb kötőszekvenciával rendelkeznek [26-28]. Továbbá, az ITC mérés során kapott sztöchiometria, miszerint egy S100A4 dimerhez kötődik egy p53 peptid, szintén alátámasztja a két komplex hasonlóságát. Eredményeink alapján tehát úgy gondoljuk, hogy a TAD N- és C-terminális régióiban potenciálisan kialakuló hélixek az S100A4 kanonikus kötősebeibe kötődhetnek, miközben a rendezetlen középső régió, összekötve a hélixeket, az S100A4 III-IV és III'-IV' hélicei által határolt árokkal hathat kölcsön. Atomi felbontású szerkezet hiányában a p53 TAD – S100A4 komplex lehetséges szerkezetét a 9. ábrán illusztráljuk.

	TP3	TP3 komplexben
Hélix	3,5	29,3
Antiparallel	7,8	0
Parallel	0	7,9
Turn	16,1	11,2
Egyéb	72,5	51,6

1. táblázat A szabad és S100A4-kötött TP3 CD spektroszkópia módszerével meghatározott másodlagos szerkezete. A másodlagos szerkezeti elemek arányát százalékosan tüntettem fel.



9. ábra Az S100A4 NMIIA-val és p53 TAD-dal képzett komplexének szerkezeti összehasonlítása. Az NMIIA – S100A4 kristályszerkezet (PDB: 3ZWH) (A) és a CBP – p53 TAD (PDB: 2L14) NMR szerkezet alapján PyMol program segítségével elkészített p53 TAD – S100A4 komplex szerkezeti modelljén (B) szürkével tüntettem fel az S100A4 dimert, míg pirossal és kékkel a miozin, illetve a p53 peptidet.

Eddigi munkám részben egy ilyen nagy felbontású szerkezeti modell megalkotásának előkészítéséről szólt. A jól körülhatárolt kötőfelszín megismerése reményeink szerint hozzájárul a p53 TAD – S100A4 komplex sikeres kristályosításához, atomi felbontású szerkezetének létrehozásához. Terveink között szerepel még a tetramerizációs domén, valamint a negatív regulációs domén és az S100A4 kapcsolatának a feltérképezése is, mivel minden újabb interakciós partner és kölcsönhatás ismerete közelebb juttathat bennünket egy olyan rákgyógyszer kifejlesztéséhez, ami emberek millióinak nyújthat segítséget.

Összefoglaló

Agresszív, áttétképzésre hajlamos tumorok esetében sokszor az S100A4/metasztazin megemelkedett koncentrációja tapasztalható. A szabályozásban betöltött szerepét, amely több ismert fehérjével történő, Ca^{2+} -függő kölcsönhatáson keresztül valósul meg, még csak most kezdjük megérteni. Az S100A4 képes kölcsönhatásba lépni a p53 tumor szupresszor fehérje N-terminálisán elhelyezkedő transzaktivációs doménnel (TAD) is, és módosítani annak működését. Célunk ennek az interakciónak a szerkezeti megismerése, hogy jobban megértsük a két fehérje által kialakított szabályozási mechanizmusokat. Egy atomi felbontású szerkezettel tisztázni lehetne a ma még sokszor ellentmondó irodalmi adatokat, megfigyeléseket is. Klónozással és heterológ fehérje expresszióval 4 egymással átfedő TAD fragmentumot állítottam elő, hogy megtaláljam a domén kötőfelszínét legszűkebben tartalmazó szakaszt. Kiderült, hogy a TAD rendezetlen N-terminális végén lévő 11 aminosav nem vesz részt a kötés kialakításában. A transzaktivációs domén TAD2 szubdoménjának fontosságára is fény derült, mivel hiányában nem jött létre interakció. Az irodalmi adatokhoz hasonló erősségű kölcsönhatást sikerült kimutatnom fluoreszcencia polarizációs (FP) ($K_d = 4 \pm 0,6\mu\text{M}$) és izotermális titráló kalorimetriás (ITC) ($K_d = 2,1 \pm 0,6\mu\text{M}$) mérésekkel. Az affinitás mellett ITC méréssel meghatároztam a kötés sztöchiometriáját és termodinamikai paramétereit is. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás vizsgálatok során a TAD másodlagos szerkezetében jelentős hélix tartalombeli növekedést figyeltem meg az S100A4-hez való kötődésekor. A kompetitív FP mérések továbbá azt mutatták, hogy a már korábban vizsgált nem-izom miozin IIA (NMIIA) és a TAD az S100A4 ugyanazon kötőfelszínéhez kapcsolódhatnak. Ezek alapján készítettünk egy S100A4 – TAD komplex szerkezeti modellt, ahol a CBP – TAD komplex NMR szerkezeténél megfigyelt két rövid hélix az S100A4 egy-egy alegységének kanonikus kötőseibe illeszkedik, kialakítva egy, az S100A4 – NMIIA szerkezetéhez hasonló aszimmetrikus fehérje komplexet. Munkám eredményeit felhasználva könnyebben eljuthatunk egy atomi felbontású szerkezet megismeréséig.

Summary

Increased concentration of S100A4/metastasin is often observed in aggressive and metastatic tumors causing higher death rate [3]. Its role in regulation, which takes place through Ca^{2+} dependent interactions with a number of known proteins, is not yet fully understood. It is known that the interaction between the S100A4 and the N-terminal transactivational domain (TAD) of the p53 tumor suppressor protein causes modifications in its functions [10, 18]. Our goal is to structurally explore the interaction to better understand the regulatory mechanisms that involve these two proteins. An atomic resolution structure could clarify the often contradictory data and observations [10, 23]. With molecular cloning and heterologue expression I produced four overlapping TAD fragments to determine the residues exclusively involved in S100A4 binding. It turned out that 11 amino acids at the N-terminus do not participate in the interaction. Moreover, we found that the presence of TAD2 subdomain is essential for the interaction. Similar affinities to former results were observed [4] using fluorescence polarization (FP) ($K_d = 4 \pm 0,6\mu\text{M}$) and isothermal titration calorimetry (ITC) ($K_d = 2,1 \pm 0,6\mu\text{M}$) techniques. Additionally, I determined the stoichiometry and the thermodynamic parameters of the interaction. According to circular dichroism (CD) spectroscopic measurements a 30% increase in the α -helix content was observed in the secondary structure of the TAD, when it was bound to the S100A4 protein. Furthermore, competitive FP measurements showed that the previously studied non-muscular myosin IIA (NMIIA) and the TAD bind to the same surface of the S100A4. Based on these results we modelled the 3D structure of the S100A4 – TAD complex, where the two short helices bind in each S100A4 canonical binding pockets forming an asymmetric protein complex, similar to the S100A4 – NMIIA structure. The results of my work facilitate the protein crystallization experiments to determine the atomic resolution structure of the S100A4 – TAD complex.

Irodalomjegyzék

1. Bohlig, L. and K. Rother, *One function--multiple mechanisms: the manifold activities of p53 as a transcriptional repressor*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 464916.
2. Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, and D. Murray, *New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 170325.
3. Jenkinson, S.R., R. Barraclough, C.R. West, and P.S. Rudland, *S100A4 regulates cell motility and invasion in an in vitro model for breast cancer metastasis*. Br J Cancer, 2004. **90**(1): p. 253-62.
4. van Dieck, J., D.P. Teufel, A.M. Jaulent, M.R. Fernandez-Fernandez, T.J. Rutherford, A. Wyslouch-Cieszyńska, and A.R. Fersht, *Posttranslational modifications affect the interaction of S100 proteins with tumor suppressor p53*. J Mol Biol, 2009. **394**(5): p. 922-30.
5. Biegging, K.T. and L.D. Attardi, *Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(2): p. 97-106.
6. Sigal, A. and V. Rotter, *Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome*. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6788-93.
7. Gabizon, R., T. Brandt, S. Sukenik, N. Lahav, M. Lebendiker, D.E. Shalev, D. Veprintsev, and A. Friedler, *Specific recognition of p53 tetramers by peptides derived from p53 interacting proteins*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38060.
8. May, P. and E. May, *Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7621-36.
9. Pei, D., Y. Zhang, and J. Zheng, *Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx*. Oncotarget, 2012. **3**(3): p. 228-35.
10. Grigorian, M., S. Andresen, E. Tulchinsky, M. Kriajevska, C. Carlberg, C. Kruse, M. Cohn, N. Ambartsumian, A. Christensen, G. Selivanova, and E. Lukanidin, *Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22699-708.
11. Lee, C.W., J.C. Ferreon, A.C. Ferreon, M. Arai, and P.E. Wright, *Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19290-5.
12. Garrett, S.C., K.M. Varney, D.J. Weber, and A.R. Bresnick, *S100A4, a mediator of metastasis*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 677-80.
13. Gingras, A.R., J. Basran, A. Prescott, M. Kriajevska, C.R. Bagshaw, and I.L. Barsukov, *Crystal structure of the Ca(2+)-form and Ca(2+)-binding kinetics of metastasis-associated protein, S100A4*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1651-6.
14. Kiss, B., A. Duelli, L. Radnai, K.A. Kekesi, G. Katona, and L. Nyitray, *Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6048-53.
15. Malashkevich, V.N., K.M. Varney, S.C. Garrett, P.T. Wilder, D. Knight, T.H. Charpentier, U.A. Ramagopal, S.C. Almo, D.J. Weber, and A.R. Bresnick, *Structure of Ca2+-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA*. Biochemistry, 2008. **47**(18): p. 5111-26.
16. Santamaria-Kisiel, L., A.C. Rintala-Dempsey, and G.S. Shaw, *Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family*. Biochem J, 2006. **396**(2): p. 201-14.
17. Grigorian, M. and E. Lukanidin, *[Activator of metastasis in cancer cells, Mst1/S100A4 protein binds to tumor suppressor protein p53]*. Genetika, 2003. **39**(7): p. 900-8.
18. C, E.L.N., B. Grum-Schwensen, A. Mansouri, M. Grigorian, E. Santoni-Rugiu, T. Hansen, M. Kriajevska, B.W. Schafer, C.W. Heizmann, E. Lukanidin, and N. Ambartsumian, *Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene*. Oncogene, 2004. **23**(20): p. 3670-80.
19. Semov, A., M.J. Moreno, A. Onichtchenko, A. Abulrob, M. Ball, I. Ekiel, G. Pietrzynski, D. Stanimirovic, and V. Alakhov, *Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20833-41.
20. Li, Z.H., N.G. Dulyaninova, R.P. House, S.C. Almo, and A.R. Bresnick, *S100A4 regulates macrophage chemotaxis*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(15): p. 2598-610.
21. van Dieck, J., T. Brandt, D.P. Teufel, D.B. Veprintsev, A.C. Joerger, and A.R. Fersht, *Molecular basis of S100 proteins interacting with the p53 homologs p63 and p73*. Oncogene, 2010. **29**(14): p. 2024-35.
22. Fernandez-Fernandez, M.R., D.B. Veprintsev, and A.R. Fersht, *Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4735-40.
23. van Dieck, J., M.R. Fernandez-Fernandez, D.B. Veprintsev, and A.R. Fersht, *Modulation of the oligomerization state of p53 by differential binding of proteins of the S100 family to p53 monomers and tetramers*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13804-11.
24. Wang, Z.X., *An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule*. FEBS Lett, 1995. **360**(2): p. 111-4.
25. Wojciak, J.M., M.A. Martinez-Yamout, H.J. Dyson, and P.E. Wright, *Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains*. EMBO J, 2009. **28**(7): p. 948-58.

26. Inman, K.G., R. Yang, R.R. Rustandi, K.E. Miller, D.M. Baldisseri, and D.J. Weber, *Solution NMR structure of S100B bound to the high-affinity target peptide TRTK-12*. J Mol Biol, 2002. **324**(5): p. 1003-14.
27. Rustandi, R.R., D.M. Baldisseri, and D.J. Weber, *Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(betabeta)*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(7): p. 570-4.
28. Rety, S., J. Sopkova, M. Renouard, D. Osterloh, V. Gerke, S. Tabaries, F. Russo-Marie, and A. Lewit-Bentley, *The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(1): p. 89-95.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok Dr. Nyitray László és Kiss Bence témavezetőimnek, hogy lehetőséget biztosítottak munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához, valamint Dr. Patthy Andrásnak és Dr. Kékesi Katalinnak a peptid szintézisért és a tömegspektrometriás mérésekért.

Köszönetet mondok Radnai Lászlónak, Rapali Péternek, Bakos Anitának és Biri Beátának hasznos szakmai tanácsaikért és segítőkészségükért.

Szerzői hozzájárulás és nyilatkozat

Név: Ecsédi Péter

ELTE Természettudományi Kar, szak: Biológia Msc.

OTDK dolgozatom címe: Az S100A4/metasztazin és a p53 kölcsönhatásának szerkezeti vizsgálata

A **dolgozat** szerzőjeként kijelentem, hogy a dolgozatom során az alábbi munkákat magam végeztem:

- A TAD fragmentumok klónozását és rekombináns fehérjeként történő előállításukat.
- Az S100A4 fehérje expresszáltatását és tisztítását.
- ITC, CD spektroszkópiás és fluoreszcencia polarizációs méréseket.
- Fehérje kristályosítását.