

Metasztázis-asszociált ezrin és S100A4 fehérjék kölcsönhatásának jellemzése

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Vadászi Henrietta

I. éves Biológus MSc hallgató

Témavezetők:

Dr. Nyitray László

Biri Beáta

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET
BIOKÉMIAI TANSZÉK



Budapest, 2014.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezető	3
Célkitűzések	6
Anyagok és módszerek.....	7
<i>In vitro</i> kötődési vizsgálat <i>pull-down</i> technikával	7
Az ezrin-S100A4 kölcsönhatás kimutatása ELISA módszerrel	8
A kötődés jellemzése triptofán fluoreszcencia méréssel	9
Rekombináns DNS konstrukciók készítése	9
A431 epiteliális karcinóma sejtek fenntartása	11
Kolokalizációs vizsgálat A431 epiteliális karcinóma sejteken.....	11
Eredmények és megvitatásuk	13
<i>In vitro</i> kötődési vizsgálat <i>pull-down</i> technikával	13
Az ezrin-S100A4 kölcsönhatás kimutatása ELISA módszerrel	15
A kötődés jellemzése triptofán fluoreszcencia méréssel	16
Kolokalizációs vizsgálat A431 epiteliális karcinóma sejteken.....	17
Összefoglaló	21

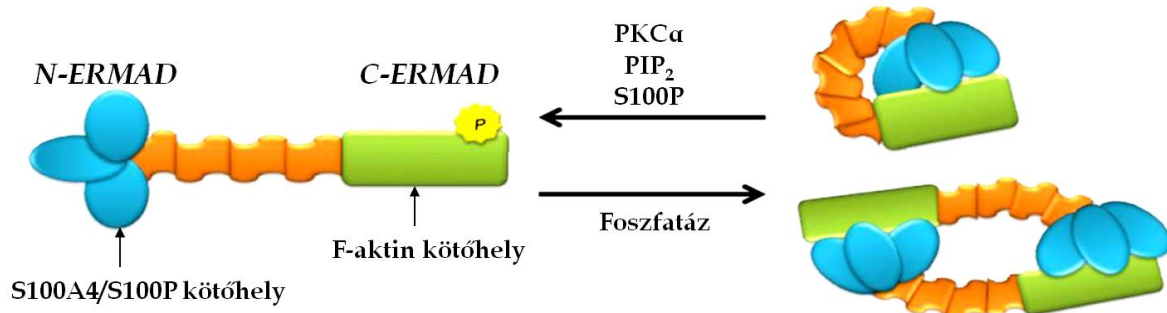
BEVEZETŐ

A rosszindulatú daganatos megbetegedések világszerte a vezető halálokok közé tartoznak. 2012-ben 8,2 millió haláleset volt köthető a tumoros elváltozásokhoz (WHO – Cancer, 2014). A betegek túlélési esélyét elsősorban a másodlagos tumorok képződése csökkenti¹. A legnagyobb problémát a késői diagnózis, valamint a kevésbé specifikus kezelési módok okozzák. Mind a diagnosztikai módszerek, mind a metasztázist célzó kezelések terén nagyfokú előrelépés várható, amennyiben a másodlagos tumorképződés molekuláris hátterére fény derül.

A metasztázis képződése bonyolult, sokszereplős folyamat. A kóros elváltozás hátterében sejtadhéziós molekulák, egyes kemokinek, különböző jelátviteli útvonalak hibás működése állhat, valamint a sejtváznak és a hozzá kapcsolódó fehérjéknek is szerepük van a másodlagos tumorok képződésében.

Ezen utóbbi csoportba sorolható az ezrin nevű fehérje, amely az ERM (ezrin/radixin/moezin) fehérjecsalád tagja. Az ezrint, valamint a többi ERM-fehérjét is, három domén építi fel: az N-terminális domén (N-ERMAD vagy FERM domén, 1-296 aminosav), a C-terminális domén (C-ERMAD, 479-585 aminosav), valamint a kettő közötti összekötő régió, az α -helikális domén (296-479 aminosav)² (**1. ábra**). Az ezrin egy adapter fehérje, összekötő funkcióval bír a kortikális filamentális aktin és a plazmamembrán között. A membrán komponensei közül kötőpartnerei lehetnek fehérjék (pl. CD44)³, de akár a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát is⁴. Az F-aktinhoz C-terminálisával kötődik, míg a membránkomponensekhez az N-terminálisával. Szerkezeti sajátossága, hogy az N- és C-terminálisa intramolekuláris kölcsönhatás révén a fehérje kötőhelyeit lefedve zárt konformációt hozhat létre, ezáltal inaktíválva önmagát². Több aktiváló mechanizmust is leírtak, amelyek az ezrin nyílt konformációjának kialakulását elősegítik. Az aktivációhoz hozzájárulhat a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát kötése⁴, vagy a C-ERMAD egy treoninjának (Thr567) foszforilációja, amelyet gyakran a protein kináz C α végez⁵.

Az ezrin metasztázis kialakulását serkentő működését több kötőpartnerével való kölcsönhatás magyarázhatja. Egyik ezek közül a vastag- és végbél daganatos sejtek inváziós frontján található L1 adhéziós molekula, amely citoszolikus régiójával az ezrinhez kötődik. Ez a komplex kötheti, valamint hozzájárulhat az I κ B (NF- κ B inhibitor) foszforilációjához. Ezzel serkentik az NF- κ B-működést, amely a növekvő tumor inváziós képességét fokozza⁶.



1. ábra: Az ezrin szerkezetének sematikus modellje. Az N-ERMAD és a C-ERMAD egymáshoz kötődve zárt konformációt hozhat létre. A protein kináz C α , a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát és az S100P is képes aktiválni. Foszfataázok által végzett defoszforiláció az inaktív konformáció kialakításához járul hozzá. (Módosítva Clucas és mtsai ábrája alapján⁷)

Az ezrin a sejtek közötti adhéziót is szabályozza. Aktív konformációban a Rho GTPázok családjába tartozó Rac1 fehérjét aktiválva serkenti az E-kadherin adhéziós molekula sejten belüli felhalmozódását. A tumorsejtek invazív fenotípusának kialakulásában kulcsfontosságú lehet az E-kadherin molekula expressziójának csökkenése vagy kiszorulása a membrán frakcióból⁸.

Irodalmi adatok szerint kalcium ionok jelenlétében az ezrin N-terminálisához kötődő S100P homodimer fehérje felszabadítja az ezrin kötőhelyeit, ezzel aktiválva a fehérjét⁴. Ennek ismeretében kezdtük el az S100P-vel azonos fehérjecsaldba tartozó S100A4 és az ezrin kölcsönhatását vizsgálni.

Az S100P az EF-kéz motívummal rendelkező, Ca²⁺-kötő S100 fehérjecsald egyik tagja. Az S100 fehérjékre jellemző, hogy főleg homo-, ritkábban heterodimereket alkotva töltik be funkciójukat⁹. Több S100 fehérjét is kapcsolatba hoztak különböző tumortípusokkal, de talán a tumoros sejtípusok legszélesebb körében az S100A4 található meg. Az S100A4 a tumorigenezist nem serkenti, hanem a képződött elsődleges tumor metasztatikus potenciálját növeli¹⁰. Számos kötőpartnerre között szerepel a p53, amely C-terminálisához kötve gátolja annak foszforilációját, valamint apoptózist indukál azon sejtekben, amelyekben vad típusú p53 található. Ezzel mintegy eliminálja az ép tumorszuppresszor p53-mal rendelkező sejteket¹¹. Az S100A4 a sejt motilitás szabályozásában is szerepet játszik, fő kötőpartnerével, a nem-izom miozin IIA (NMIIA) motorfehérjével való kölcsönhatása révén. Az NMIIA C-terminális *coiled-coil* régiójához kötődő S100A4 destabilizálja a képződött filamentumokat, ugyanis a kötőhelye átfed a filamentum-képződésben fontos doménnel¹². Az NMIIA izoforma a sejt adhéziós komplexeinek érését serkenti, valamint a sejtelen polimerizálódó aktin

visszahúzásában (*retrograde flow*) van szerepe, ezáltal a sejtmigrációt lassítja. Ez magyarázatként szolgálhat tehát arra, hogy az S100A4 az aktinpolimerizáció és az NMIIA visszatartó ereje közti egyensúly megváltoztatásával a sejtnak gyorsabban migráló, invazív fenotípust kölcsönöz¹³.

Mind az ezrint, mind az S100A4 fehérjét számos daganattípus emelkedett metasztatikus potenciáljával összefüggésbe hozták. Több tumorsejt típus esetén mindkét fehérje szerepet játszhat a várhatóan negatív kimenetelű kór kialakulásában (pl. az S100A4 és az ezrin expressziójának növekedése megfigyelhető mellrákos^{14,15}, gyomordaganatos^{16,17} sejtekben). Az egyes tumortípusokban az ezrin és az S100A4 részletes hatásmechanizmusának feltárása egyelőre még várat magára. Nem kizárható, hogy a két fehérje kölcsönhatása hozzájárul a metasztázis előfordulási valószínűségének növekedéséhez, akár jelátviteli útvonalakban való részvétel által, akár a sejtvázon keresztül a motilitás növelésével.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaim célja, hogy két metasztázis-asszociált fehérje, az ezrin és S100A4 közötti kölcsönhatást mind *in vitro* körülmények között, mind tumoros sejtvonalban kimutassam.

A kutatás menete:

- A fehérjék közti kötődés kimutatása *pull-down* technika, valamint ELISA módszer segítségével.
- Az N-ERMAD és S100A4, valamint az N-ERMAD és nemkötő mutáns S100A4 (S100A4Ser Δ 13) kölcsönhatás affinitásának meghatározása triptofán fluoreszcencia mérés alapján.
- Rekombináns DNS konstrukciók készítése, amelyben a vad típusú vagy mutáns S100A4 fehérjét kódoló DNS szakasz mCherry fluorofórt kódoló szakasszal van fuzionáltatva.
- Ezen DNS konstrukciók A431 epiteliális karcinóma sejtvonalba juttatása.
- Sejtfixálást követően, (az endogén módon expresszált ezrint immunfestéssel láthatóvá téve) az S100A4 és ezrin kolokalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópia segítségével.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

In vitro kötődési vizsgálat *pull-down* technikával

Az ezrin és S100A4 közti kölcsönhatás vizsgálatához protein G agaróz gyöngyöket (Protein G PLUS Agarose Suspension, Calbiochem) használtam. A kísérletben 3 μM rekombináns teljes hosszúságú ezrint vagy N-ERMAD-ot 6 μM rekombináns S100A4 jelenlétében, illetve 3 μM rekombináns teljes hosszúságú ezrint S100A4 hiányában inkubáltam 1 órán keresztül szobahőmérsékleten IP pufferben (20 mM HEPES (pH=7,3), 150 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 2,5 mM CaCl_2). Az inkubálási idő leteltével az egyes oldatokhoz 10-10 μg anti-humán S100A4 monoklonális egér IgG antitestet (PR006.21.3 (#4), Dr. Jörg Klingelhöfer laboratóriumából) adva, további 2 órát inkubáltam szobahőmérsékleten. A protein G agaróz gyöngyöket (30-30 μl 50%-os szuszpenziót) használatuk előtt IP pufferben háromszor mostam, majd IP pufferben oldott 10%-os BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) oldattal blokkoltam 5 percig az aspecifikus kötődés elkerülése érdekében. A gyöngyöket az immunkomplexeket tartalmazó oldatokhoz adva enyhe rázatás mellett inkubáltam 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően háromszor mostam IP pufferben. Végül 50 μl SDS-kezelőt a mintákhoz adva 5 perces forralással eluáltam.

Kvalitatív értékeléshez 20-20 μl elúcióval SDS poliakrilamid gélelektroforézist (200 V, kb. 1 óra) végeztem 10%-os Tris-tricines gélen, amelyet Coomassie festékkel 10 percig festettem, majd 2 órán át festéktelenítő oldattal kezeltem.

A *Western blot* során az elúciókból 5-5 μl -rel újabb SDS-PAGE-t végeztem (150 V, kb. 1,5 óra) 10%-os Tris-tricines gélen. A gél, a PVDF membránt és a szűrőpapírokat 15 percig áztattam blottoló pufferben (10% metanol, 25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1% SDS). A PVDF membránt az áztatás előtt 15 másodpercig 100%-os metanolban, majd 2 percig vízben inkubáltam. A blottolás 2 órán keresztül tartott 100 mA áramerősségen *semi-dry* blottoló készülékben (Gentaur). Ezután a PVDF membránt átszűrte, TBS-T-ben (20 mM Tris pH=7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween[®] 20) oldott 5%-os tejporral blokkoltam 1,5 órán át. A membránt egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltam enyhe rázatás mellett az 5%-os tejporban 1:1000 arányban hígított elsődleges antitesttel (anti-ezrin egér monoklonális IgG, Santa Cruz). Négyyszer 15 percig mostam a membránt TBS-T-vel. 1,5 órát inkubáltam az 5%-os tejporban 1:3000 arányban hígított másodlagos antitesttel (kecskében termelt anti-egér HRP-konjugált

antitest, Santa Cruz). Újabb négyszer 15 perces TBS-T-vel történő mosást követően a membránt kétszer 5 percig 1x Assay Pufferrel (Applied Biosystems) kezeltem. Az előhívás a szubsztrát (Pierce ECL Western Blotting Substrate) hozzáadásával kemilumineszcencián alapul, fotópapírra történik, előhívó, majd fixáló oldatban, végül vízben történő áztatással.

Az ezrin-S100A4 kölcsönhatás kimutatása ELISA módszerrel

A kötődés kimutatásához 96-lyukú Maxisorp® *plate*-re 30 µg/ml vadttípusú rekombináns ezrint, 15 µg/ml rekombináns N-ERMAD-ot immobilizáltam 0,1 mM EDTA-t tartalmazó TBS pufferben (20 mM Tris pH=7,4, 150 mM NaCl). Az immobilizálás 4 °C-on zajlott egy éjszakán át enyhe rázatás mellett. Ezt követően 0,1 mM EDTA-t tartalmazó, 5 mg/ml koncentrációjú TBS-ben oldott BSA-oldattal (BSA-TBS) blokkoltam az egyes lyukakat fél órán keresztül szobahőmérsékleten. Minden lyukra 30 µg/ml-től (dimer S100A4 koncentrációt tekintve 1,25 µM-tól) 7 tagú felező hígítási sorban S100A4 rekombináns fehérjét mértem, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam (a BSA-TBS puffer ez esetben EDTA helyett 5 mM CaCl₂-ot és 0.1% Tween® 20-at tartalmazott, a továbbiakban az antitestek oldásához is ezt a puffert használtam). Ezt követően 5 mM CaCl₂-ot tartalmazó TBS-T-vel háromszor mostam a lyukakat, majd 1:2000 arányban hígított elsődleges antitestet (egér anti-humán S100A4 monoklonális IgG antitest, PR006.21.3 (#4)) mértem rájuk (1 óra, szobahőmérséklet). Háromszori mosást (5 mM CaCl₂-ot tartalmazó TBS-T-vel) követően rámértem az 1:2000 arányban hígított másodlagos antitestet (kecskében termelt anti-egér HRP-konjugált IgG antitest, Santa Cruz). 45 perc múlva háromszor mostam a lyukakat. Az előhívást TMB szubsztrát segítségével végeztem (Thermo Scientific), a színreakciót 1 M-os HCl oldattal állítottam le. Az abszorbanciát 450 nm-es hullámhosszon BioTek *plate reader*-rel olvastam le. Kontroll kísérletben nem immobilizáltam ezrint, a blokkolástól kezdve kezeltem a fent írtaknak megfelelően a lyukakat. Ezek abszorbanciájának értékét a kiértékelés során kivontam az ezrint is tartalmazó lyukak abszorbanciájából. A disszociációs állandó számítását az Origin®8 program segítségével az

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) \cdot \frac{(c_1 + c_2 + K_d - \sqrt{(c_1 + c_2 + K_d)^2 - 4 \cdot c_1 \cdot c_2})}{(2 \cdot c_1)} \quad \text{egyenlet alapján}$$

végeztem, ahol c_1 az S100A4 koncentrációja, c_2 az N-ERMAD vagy ezrin koncentrációja, K_d a

kötés disszociációs állandója, I a mért fény intenzitása, $I_{\max}$ és $I_{\min}$ a fény intenzitása, mikor az alkalmazott S100A4 mennyiség egésze ($I_{\max}$) vagy semekkora hányada ($I_{\min}$) létesít kötést.

A kötődés jellemzése triptofán fluoreszcencia méréssel

A mérés során használt rekombináns N-ERMAD koncentrációja állandó, 0,25 μM . A rekombináns S100A4 vagy S100A4Ser Δ 13 fehérjékkel 4 μM -tól (dimer koncentrációt tekintve 2 μM -tól) 10 tagú felező hígítási sort készítettem. A hígítást 20 mM HEPES (pH=7,5), 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 1 mM CaCl_2 tartalmú pufferben végeztem. Az oldatokat 60 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd fekete 384-lyukú *plate*-en BioTek *plate reader* segítségével kiviteleztem a mérést a következő beállításokkal: extinkció: 297 nm (± 9), emisszió: 340 nm (± 9). A disszociációs állandó számítása a fent leírtaknak megfelelően történt.

Rekombináns DNS konstrukciók készítése

A plazmid DNS konstrukciókban az mCherry fluoreszcens fehérjét kódoló DNS szakaszt követi a vad típusú S100A4 vagy mutáns S100A4Ser Δ 13 (Cys81Ser, utolsó 13 aminosav nélkül) fehérjét kódoló DNS szakasz. (Ezáltal a pmCherry-C1-S100A4 és pmCherry-C1-S100A4Ser Δ 13 vektorok előállítására volt a cél). Mindez biztosítja, hogy a plazmidról átíródó S100A4 vagy mutáns S100A4 fehérje N-terminálisán fuzionáltatva lesz a fluorofórral.

Az üres vektor (pmCherry-C1) előállításához pEGFP-C1 (Clontech) plazmidban az eGFP fluorofórt kódoló DNS szakaszt mCherry fluoreszcens fehérjét kódolóra cseréltem *NheI* és *BspEI* restrikciós endonukleázok segítségével. Templátként mCherry fehérjét kódoló vektort használtam, PCR reakció segítségével hoztam létre a két restrikciós endonukleáz felismerőhelyét a következő két primer segítségével:

Forward: 5'-GGATATGCTAGCGCTACCGGTCGCACCATGGTGAGCAAGGGC-3'

Reverse: 5'-GCGTATTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCA-3'

A PCR reakció során alkalmazott paraméterek:

95 °C, 2 perc (aktiváció); 95 °C, 20 mp (denaturáció); 63 °C, 10 mp (annealáció); 70 °C, 15 mp (elongáció); 70 °C, 5 perc (végső lánchosszabbítás); 35 ciklus. Kod Hot Start DNS polimerázt használtam.

Ezt követően az előállított inszertet (mCherry fluorofórt kódoló szakaszt) 1%-os agaróz gélben futtatás után a gélből izoláltam, majd DNS-tisztító kittel (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Bio Basic Inc.) tisztítottam. Mind a vektort (peGFP-C1), mind az inszertet szekvenciálisan emésztettem *NheI* (Fermentas), majd *BspEI* (New England Biolabs) restrikciós endonuklázzal, egyenként 2 órát 37 °C-on először Tango puffer (Fermentas), majd NEBuffer 3.1 puffer (New England Biolabs) használatával. A hasított vektort 1%-os agaróz gélből izoláltam, majd ezt és az inszertet DNS-tisztító kittel tisztítottam. A DNS darabokat T4 DNS ligáz enzimmal (Fermentas) ligáltam T4 DNS ligáz pufferben (Fermentas) 45 percig szobahőmérsékleten. A ligátumot DH5α *E. coli* sejtekbe transzformáltam: 100 µl kompetens sejthez 10 µl ligátumot adtam, majd 15 percig jégen inkubáltam. Ezt követően hűsokkoltam a sejteket 1 percig 42 °C-on, majd 2 percig jégen tartottam. 300 µl LB táptalaj hozzáadását követően a sejteket 37 °C-os rázó inkubátorba tettem 30 percre a kanamicin rezisztencia gén kifejeződéséhez. A transzformált sejteket 30 µg/ml kanamicint tartalmazó LB táptalajokra szélesztettem, egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem. A kinőtt telepek közül a megfelelő plazmid konstrukciót tartalmazók kiválasztását PCR reakció (Dream Taq DNS polimeráz, Fermentas) segítségével végeztem. Az ehhez használt primer oligonukleotidok egyike vektor-specifikus (5'-GTCTATATAAGCAGAGCT-3'), míg a másik (5'-ATCATCATCATCCTGGATCCCGCCCAGGATGTTGCCGTC-3') csak az eGFP fluorofórt kódoló szakaszhoz kötődik, az mCherry-éhez nem. Ebből következően a PCR termék hiánya jelenti a pozitív eredményt. Az ilyen eredményt adó telepekről leoltottam 3-3 ml 30 µg/ml kanamicint tartalmazó LB táplevesbe, amelyeket 37 °C-on egy éjszakán át rázó inkubátorban növesztettem. Végül plazmid tisztító kit segítségével (EZ-10 Spin Column, Plasmid DNA kit, Bio Basic Inc.) a pmCherry-C1 plazmidokat izoláltam.

Az előállított pmCherry-C1 plazmidot vektorként használva létre lehetett hozni a tervezett konstrukciókat. Az S100A4SerΔ13 inszertet PCR reakció segítségével állítottam elő pIRES2-S100A4SerΔ13-GFP templát használatával. A reakcióban használt primer oligonukleotidok tartalmazzák az emésztésnél használandó két restrikciós endonukleáz felismerőhelyét:

Forward: 5'-GGATAT GGTACCATGGCGTGCCCTCTG-3'

Reverse: 5'-CGGGATCCTTATTCGTTACACATCAT-3'

A PCR reakció paraméterei:

95 °C, 2 min (aktiváció); 95 °C, 20 s (denaturáció); 55 °C, 10 s (annealáció); 70 °C, 10 s (elongáció); 70 °C, 5 min (végső lánchosszabbítás); 35 ciklus

Az előállított inszertet 1%-os agaróz gélből izoláltam, majd DNS-tisztító kit (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Bio Basic Inc.) segítségével tisztítottam.

Az S100A4-et kódoló inszert előállítását egy kész konstrukcióból (pEGFP-S100A4-C1) *Bam*HI-HF és *Kpn*I-HF (New England Biolabs) restrikciós endonukleázokkal végzett hasítással végeztem CutSmart pufferben (2 órán át 37 °C-on). Ugyanezen enzimekkel emésztettem a pmCherry-C1 vektort és az S100A4Ser Δ 13 mutáns inszertet is 37 °C-on 2 órán át. A továbbiakban a vektor előállításánál leírt módon jártam el. A megemésztett vektort 1%-os agaróz gélből izoláltam, majd az inszertekkel DNS-tisztító kittel tisztítottam, fent olvasható módon végzett ligálás és transzformálás után a másnapra kinőtt telepeket PCR reakcióval szkrínéltem. Azokról a telepekről, amelyek pozitívnak bizonyultak, leoltottam, majd a plazmidot tisztítottam a fent leírtaknak megfelelően.

A szekvenciát Sanger-féle automata szekvenálással ellenőriztettük a fenti vektor-specifikus oligonukleotid segítségével.

A431 epiteliális karcinóma sejtek fenntartása

Az A431 tumoros sejtvonal Dr. Buday László laboratóriumából származik (Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet). A sejtek növesztése 25 cm²-es sejtenyészítő flakákban, Pen/Strep/Amphotericin B Mixture (Lonza) tartalmú DMEM (4,5 g/l glükóz és L-glutamin, Lonza) médiumban, 10% szérum (FBS, Biowest) mellett, 5%-os CO₂-tartalmú, 37 °C-os inkubátorban történt. Sejtpasszáláshoz EDTA-tartalmú tripszin oldatot használtam (Trypsin-Versene EDTA Mixture 200mg/l EDTA 170000U tripszin/l, Lonza).

Kolokalizációs vizsgálat A431 epiteliális karcinóma sejteken

A kísérlethez a fenntartott A431 sejtvonalat tárgylemezre erősített tenyésztő kamrákban (8-kamrás Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ system) növesztettem. A sejtek számának meghatározásához Bürker-kamrát használtam, 20.000 sejt került egy kamrába. Két nappal később az A431 sejteket kb. 60%-os konfluenciánál FuGene HD (Promega) transzfekciós reagens segítségével transzfektáltam. A transzfektálás során 100 µl Optimem (szérummentes) médiumhoz 550 ng plazmid DNS-t (pmCherry-C1 vagy pmCherry-C1-S100A4 vagy

pmCherry-C1-S100A4Ser Δ 13), majd 2,2 μ l FuGene reagenst adtam, majd szobahőmérsékleten inkubáltam 20 percig. Ezután az oldatokat a sejteken lévő tápoldathoz csepegtettem. A transzfektáló reagenst tartalmazó oldat 6 órán át maradt a sejteken, majd ezt szérummentes DMEM médiumra cseréltem. 14 óra elteltével 10 μ g/ml koncentrációjú EGF-fel (Epidermal Growth Factor) stimuláltam a különböző konstrukciókkal transzfektált sejteket, az ugyanezen plazmidokkal transzfektált kontroll sejteket nem kezeltem EGF-fel. A stimulálást 15 percig végeztem 37 °C-os inkubátorban, ezt követően a médiumot eltávolítottam a kamrákról, 37 °C-os PBS-sel (Phosphate Buffered Saline, Lonza) mostam, majd 4%-os paraformaldehiddel (PBS-ben oldva) 20 percig szobahőmérsékleten fixáltam. A fixálást követően háromszor mostam a kamrákat PBS-sel, majd PBS-ben oldott 0,1%-os Triton-X oldattal permeabilizáltam a sejteket 15 percig. Az inkubálási idő leteltével PBS-ben oldott 0,5%-os BSA oldattal (PBB) háromszor mostam a kamrákat, majd 2%-os BSA oldattal blokkoltam a preparátumot 45 percig szobahőmérsékleten. 2%-os BSA oldatban hígítottam az elsődleges antitestet (anti-ezrin egér monoklonális IgG antitest, Santa Cruz) 1:300 arányban. Az elsődleges antitesttel 1 órán keresztül inkubáltam a sejteket fénytől védett helyen. Az inkubálást követően a preparátumot ötször mostam PBB-vel, majd a 2%-os BSA oldatban 1:800 arányban hígított másodlagos antitestet (kecskében termelt anti-egér Alexa-488-konjugált antitest, Life Technologies) adtam a kamrákhoz. 1 órás fénytől védett helyen történő inkubálást követően ötször mostam a kamrákat PBB-vel, majd magfestés céljából PBS-ben oldott 0,1 μ g/ml koncentrációjú DAPI (Life Technologies) oldattal kezeltem a sejteket 5 percig fénytől védetten. Ezt követően háromszor mostam mosásonként 3 percig PBS-sel a preparátumot. A lefedést 24x40 mm-es fedőlemezzel végeztem Mowiol ragasztóanyag segítségével.

A preparátumokról szemikonfokális mikroszkóppal készültek képek (Zeiss Axioimager Z1, használt program: Axiovision 4.2, Apotome 1 szemikonfokális feltét használatával, a megfelelő szűrők beállításával). Az elkészült képek feldolgozásához az ImageJ program nyújtott segítséget.

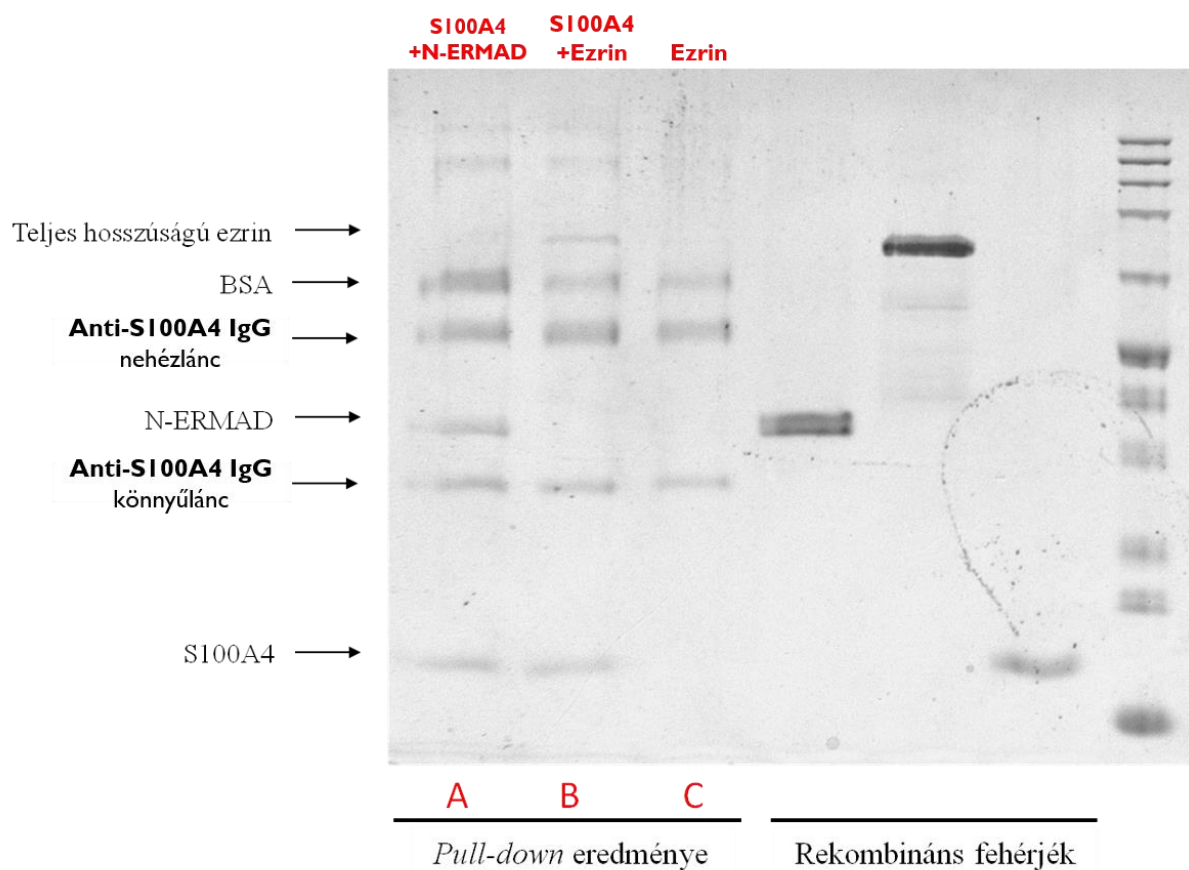
Az A431 sejtvonal endogén ezrint expresszál, amelyet *western blot* segítségével mutattunk ki. A sejtek líziséhez használt lízis puffer: 1% Triton-X, 25 mM Tris, pH=7,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM DTT, 2 mM EDTA, proteáz inhibitor koktél. A PBS-sel mosott és centrifugált (1200 rpm, 4 perc) sejteket 30 percig, 4 °C-on lizáltuk, majd 30 perc (4 °C, 14000 rpm) centrifugálás után a 8 μ g/ μ l fehérjekoncentrációjú felülúszóból 12 μ l-t futtattunk a 10%-os Tris-tricines gélen. Kontrollként 100 és 500 ng rekombináns ezrint használtunk. A *western blot* a továbbiakban a fent leírt módon történt.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

In vitro kötődési vizsgálat *pull-down* technikával

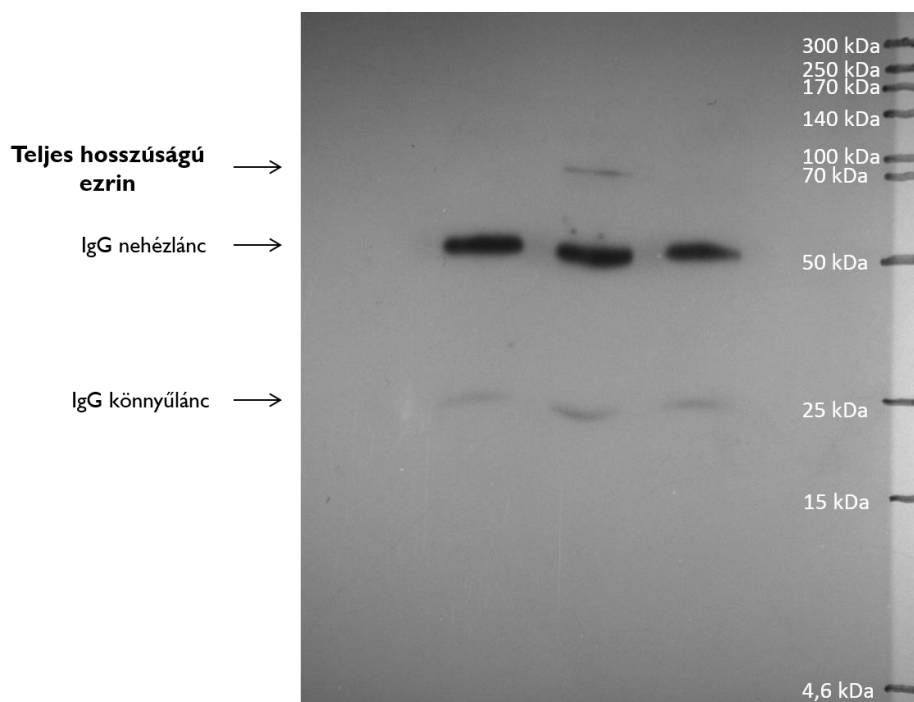
A kísérlettel bizonyítani kívántam, hogy az S100A4 Ca^{2+} jelenlétében *in vitro* körülmények között köti a teljes hosszúságú ezrint, illetve az ezrin N-terminális doménjét.

A kötődési vizsgálat során S100A4 fehérjére specifikus IgG antitestet használtam. Az IgG antitest Fc-régiója poláros kölcsönhatásokon alapuló kötést létesít a *Streptococcus*-eredetű protein G-vel¹⁸. Ezáltal a kísérletben használt protein G agaróz gyöngyökre az S100A4 immobilizálódott. A vizsgálatot rekombináns fehérjékkel végeztem. Az aspecifikus kötődés kimutatásához kontroll kísérletben az S100A4-specifikus antitesttel csak teljes hosszúságú ezrint inkubáltam S100A4 nélkül (**2. ábra C oszlop**). A többszöri mosást követő SDS-kezelővel történő kezeléssel kapott elúciókat a **2. ábrán** látható SDS-PAGE eredménye mutatja. Mind a teljes hosszúságú ezrin (**2. ábra B oszlop**), mind az N-terminális doménje (**2. ábra A oszlop**) kikötődött az immobilizált S100A4-hez Ca^{2+} mellett. Tehát az S100A4 az ezrin N-terminális doménjéhez kötődik. Az elúció során mindhárom kísérletnél konzekvensen megjelent a blokkolásnál használt BSA (~67 kDa az SDS-gélen), valamint az immobilizáláshoz használt antitest nehéz-és könnyűlánc (~50 kDa és ~25 kDa az SDS gélen).



2. ábra: A protein G agaróz gyöngyökkel végzett *pull-down* kísérlet eredménye.
A: N-ERMAD és immobilizált S100A4; **B:** teljes hosszúságú ezrin és immobilizált S100A4; **C:** teljes hosszúságú ezrin S100A4 nélkül (kontroll).

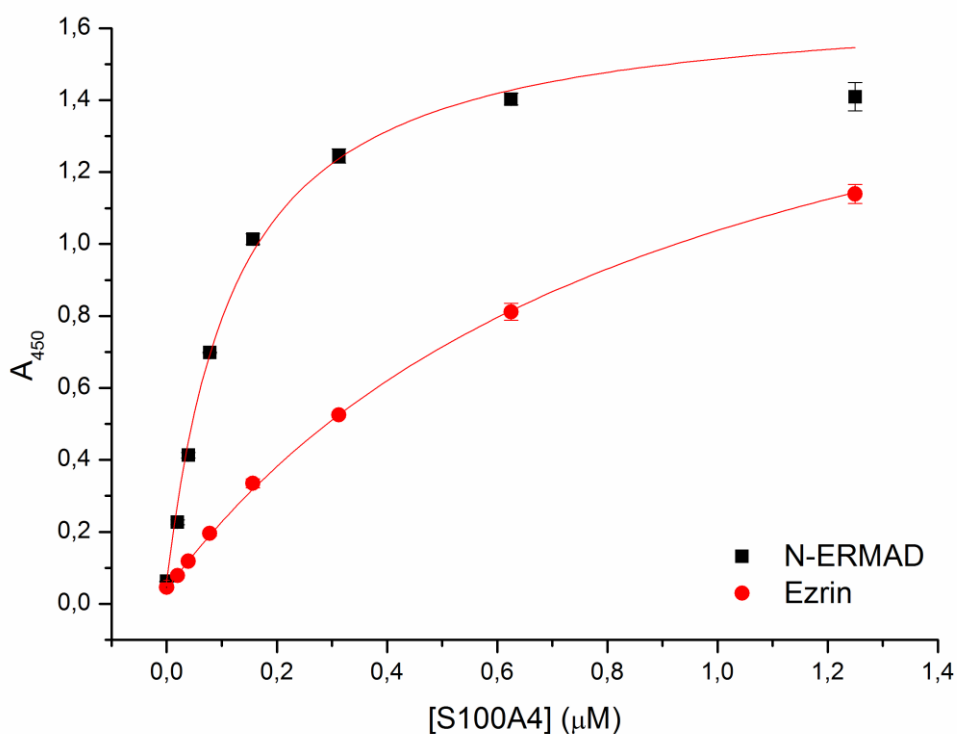
A *western blot* készítésénél ezrin-specifikus antitest használatával bizonyítható, hogy valóban ezrin kötődött ki az immobilizált S100A4-hez (**3. ábra**). A *western blot* során az anti-egér másodlagos antitest a *pull-down*-nál használt egerből származó S100A4-specifikus antitest nehéz-és könnyűláncát is kimutatta. Az N-ERMAD nem jelenik meg, mivel a kísérlet során felhasznált elsődleges antitest az ezrin C-terminálisához kötődik.



3. ábra: A 2. ábrán bemutatott gélen futtatott mintákkal (A,B,C oszlopok) készült western blot. A nehézlánc 50 kDa-nál, a könnyűlánc 25 kDa-nál látható, az ezrin kb. 80 kDa-nál fut.

Az ezrin-S100A4 kölcsönhatás kimutatása ELISA módszerrel

A mérés kitűzött célja volt a kölcsönhatás kimutatása a teljes hosszúságú ezrin, az N-ERMAD és az S100A4 között, valamint az egyes kötődések hozzávetőleges disszociációs állandóinak meghatározása. A kötődési vizsgálathoz ezúttal vad típusú teljes hosszúságú ezrint, illetve N-ERMAD-ot immobilizáltunk. Mindkét esetben sikerült kimutatni az S100A4 fehérjével való kötődést. A **4. ábrán** látható, hogy az N-ERMAD-hoz nagyobb affinitással kötődik az S100A4, mint a vad típusú ezrinhez, amely alátámasztja, hogy ezen a doménen található a kötőhelye. A méréssel kapott disszociációs állandók az **1. táblázat**ban találhatóak. A disszociációs állandó számításának részletei az *Anyagok és módszerek* ide vonatkozó részénél megtalálhatóak.



4. ábra: Az S100A4 kötődése a vad típusú ezrinhez és az N-ERMAD-hoz.

	K_d (μ M)	<i>Standard Error</i>
N-ERMAD	0,116	0,012
Ezrin vad típus	0,916	0,076

1. táblázat: Az ELISA módszerrel kapott disszociációs állandók a vad típusú S100A4 fehérjével.

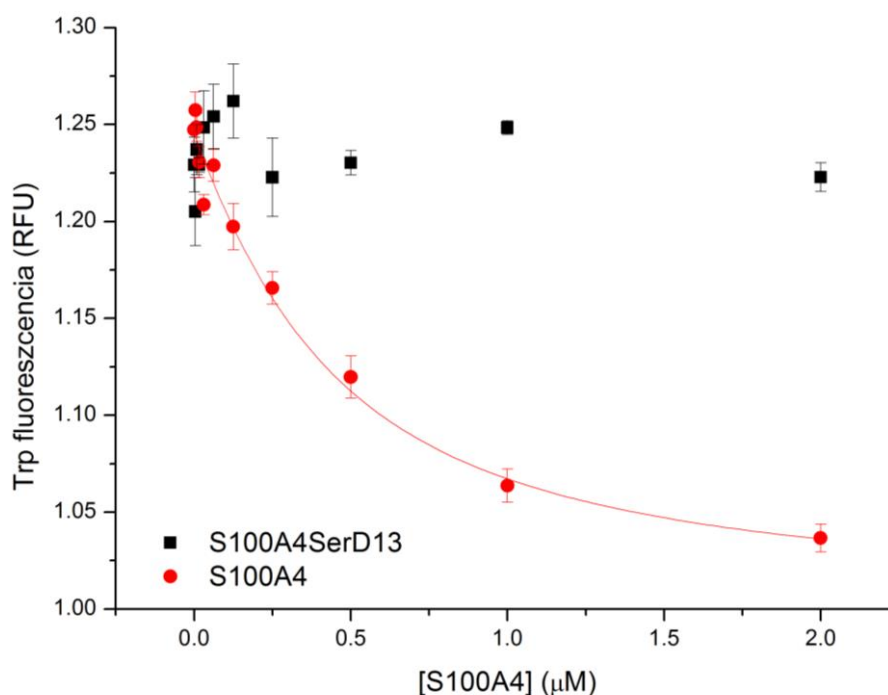
A kötődés jellemzése triptofán fluoreszcencia méréssel

A mérés alapja, hogy az N-ERMAD-ban az S100P kötőhelye¹⁹ alapján az S100A4 feltételezett kötőhelyén egy triptofán aminosav található. Amennyiben az S100A4 kötődik az N-ERMAD-hoz, a triptofán lefedésével a megfelelő gerjesztési és emissziós hullámhosszat alkalmazva fluoreszcencia-változás mérhető.

A kísérlettel az N-ERMAD és az S100A4 fehérjék közti kölcsönhatás disszociációs állandójának meghatározását végeztük. A mérés másik célja, hogy kimutassuk az N-ERMAD és S100A4SerΔ13 mutáns fehérjék közti esetleges kötődést. A labor korábbi méréseinek eredményeként feltehető, hogy az N-ERMAD és a nem-izom miozin IIA verseng az S100A4

kötésért, tehát kötőhelyük valószínűleg átfed az S100A4-en. Az S100A4Ser Δ 13 mutáns fehérje nem kötődik a nem-izom miozin IIA-hoz¹², tehát feltételezhetjük, hogy az N-ERMAD-hoz sem köt. Ez a feltevés triptofán fluoreszcencia méréssel bizonyítható.

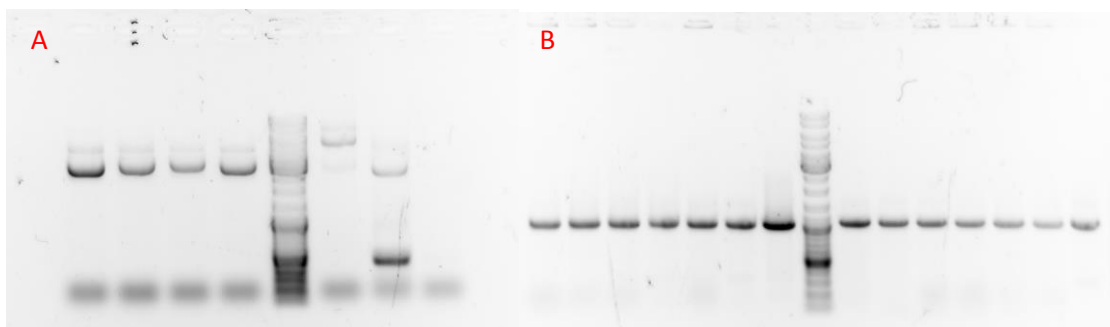
A mérés alapján **(5. ábra)** az S100A4 0,3 μ M-os disszociációs állandóval kötődik az ezrinhez, ami összeeseng az ezrin-S100P kölcsönhatás affinitásával¹⁹. Ezzel szemben az S100A4Ser Δ 13 és az ezrin között nem mutatható ki kötődés, tehát a mutáns fehérje a későbbi kolokalizációs vizsgálatokban használható negatív (nem-kötő) kontrollként.



5. ábra: Triptofán fluoreszcencia mérés S100A4-ezrin és S100A4Ser Δ 13-ezrin kölcsönhatások esetében. Az S100A4 kb. 0,3 μ M-os disszociációs állandóval kötődik, míg az S100A4Ser Δ 13 nem mutat jelentős affinitást az ezrinhez.

Kolokalizációs vizsgálat A431 epiteliális karcinóma sejteken

A szekvenálás eredménye megerősítette, amit az előzőleg elvégzett szkrínélések során vártunk **(6. ábra)**, hogy a kívánt plazmid konstrukciókat (pmCherry-C1, pmCherry-C1-S100A4, pmCherry-C1-S100A4Ser Δ 13) sikerült előállítani, a későbbiekben ezekkel dolgozhattam. Az A431 epiteliális karcinóma sejtekben az mCherry vagy mCherry fluorofórral fuzionáltatott S100A4 vagy S100A4Ser Δ 13, illetve az immunfestéssel megjelölt endogén ezrin kolokalizációját vizsgáltam **(8, 9, 10. ábra)**.

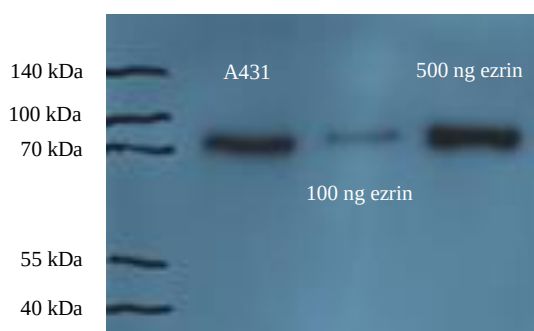


6. ábra: Az elkészített plazmid konstrukciókról készült szkrínelés agaróz gélképen.

A: pmCherry-C1 plazmid szkrínelése (a gélképen balról jobbra látható: négy *E. coli* telepről leoltott, pucolt minipreparátum, létra, a klónozás során templátként használt mCherry fluorofórt kódoló plazmid, pEGFP-C1). A PCR termék hiánya pozitív eredményt jelent, hiszen a használt *reverse* primer oligonukleotid csak a GFP-t kódoló szakaszhoz anellál.

B: pmCherry-C1-S100A4SerΔ13 és pmCherry-C1-S100A4 plazmidok szkrínelése (a gélképen balról jobbra látható: hat pmCherry-C1-S100A4SerΔ13 plazmidot tartalmazó *E. coli* telepről készült PCR termék, pmCherry-C1-S100A4SerΔ13 ligátumról készült PCR termék, létra, hat pmCherry-C1-S100A4 plazmidot tartalmazó *E. coli* telepről készült PCR termék, pmCherry-C1-S100A4 ligátumról készült PCR termék).

Az ezrin endogén expressziójának bizonyítását *western blot* segítségével végeztük A431 sejtliniából (**7. ábra**).

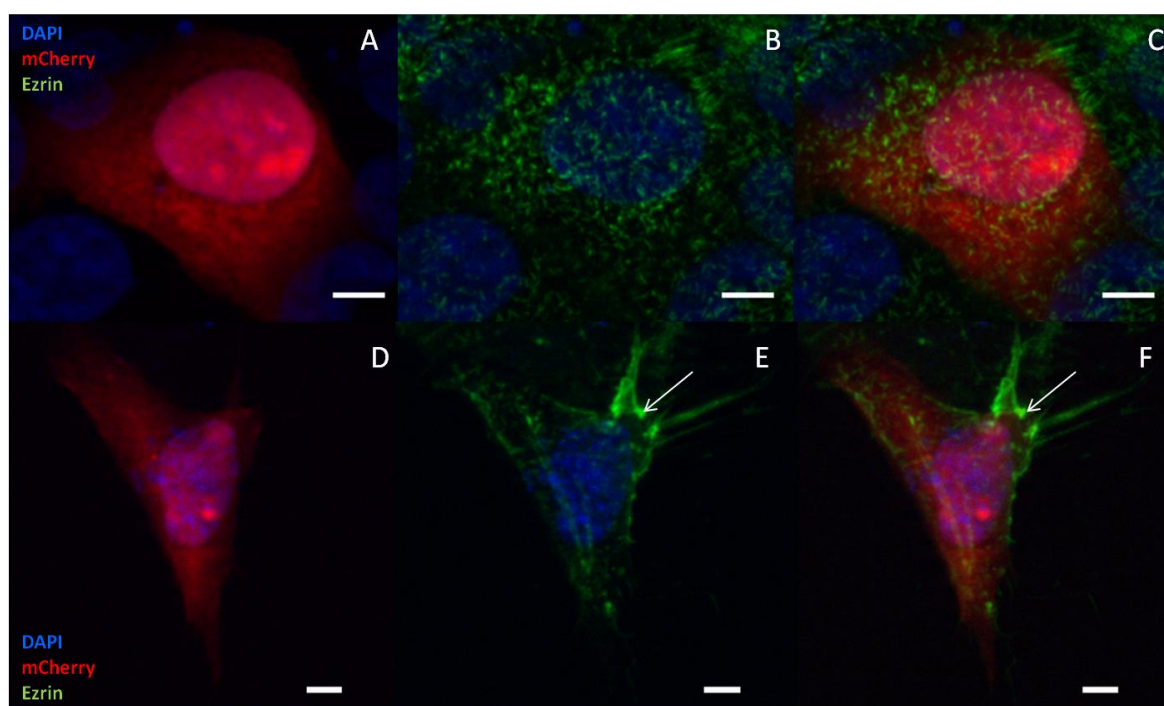


7. ábra: Az A431 sejt vonal endogén ezrin expressziója.

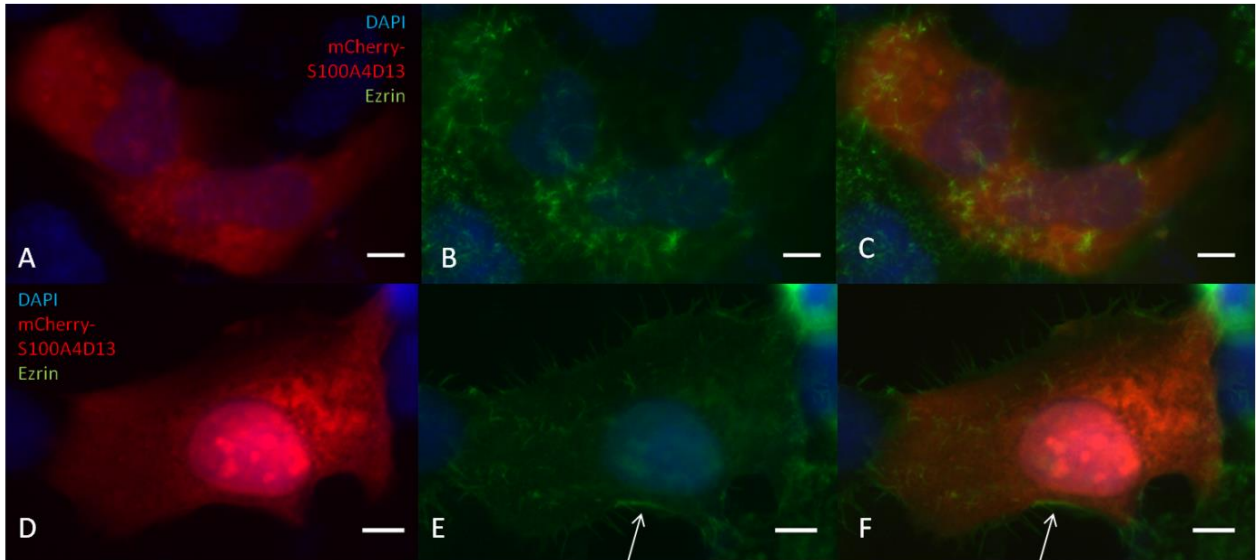
Számos esetben megfigyelték, hogy az ezrint túlexpresszáló A431 sejtek EGF stimulálás hatására hosszabb, több filopódiumot fejlesztenek²⁰. Lehetséges, hogy a sejtek EGF-kezelése az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedésén keresztül S100P általi ezrin aktivációt okoz, ami ezáltal a membrán mikrovillusaiba transzlokálódik⁴. Feltételeztük, hogy hasonló módon hathat az S100A4 is.

Az mCherry fluorofórt (**8. ábra**) vagy mCherry-S100A4SerΔ13 fúziós fehérjét (**9. ábra**) kódoló plazmiddal transzfektált sejtekben a termelődő fehérjék EGF kezeléstől függetlenül nem kolokalizáltak az immunfestéssel jelölt ezrinnel. Ezzel szemben az mCherry-S100A4 fehérjét kódoló plazmiddal történő transzfektálás után a képződött mCherry-S100A4 fúziós fehérje EGF-kezelés hatására kolokalizációt mutatott az immunfestéssel láthatóvá tett ezrinnel (**10./D**,

E, F ábra). Ez a hatás elmaradt, amennyiben nem történt meg az EGF-fel való stimulálás (**10./A, B, C ábra**). Ennek több lehetséges oka van. Az EGF-stimulus hatására foszfolipáz C (PLC) aktiválódik, amely enzim foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát hasításával diacilglicerolt (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfátot (IP₃) eredményez. Utóbbi az endoplazmatikus retikulum Ca²⁺ csatornáinak nyitásával az endoplazmatikus retikulum „raktárából” Ca²⁺-ot szabadít fel, ezzel hozzájárulva (egyéb sejtteni folyamatok mellett) a kalciumkötő fehérjék aktivációjához. Ez utóbbiak közé tartozik az S100A4 is, amely Ca²⁺-ot kötve célfehérjéihez kötődhet, köztük az ezrinhez is. Más oldalról megközelítve, a PLC aktivitása során felszabaduló másik termék, a DAG a protein kináz C (PKC) aktivátora. Egyes izoformák aktivációjához továbbá Ca²⁺ is szükséges, ilyen a PKC α is, amely az ezrin 567-es pozíciójában lévő treonin foszforilációjával kialakítja annak nyílt, aktív konformációját, feltárva a fehérje kötőhelyeit. Az ilyen módon funkcióképesé vált ezrin kötőpartnereivel (beleértve az S100A4-et is) kialakíthat kölcsönhatást.



8. ábra: A431 sejtek mCherry-t kódoló plazmiddal transzfektálva, ezrin másodlagosan Alexa-488 konjugált antitesttel jelölve. **A, B, C:** EGF stimulus nélkül. A filopódiumok rövidebbek
D, E, F: EGF stimulust követően hosszú filopódiumokkal.
 Kolokalizáció egyik esetben sem figyelhető meg.

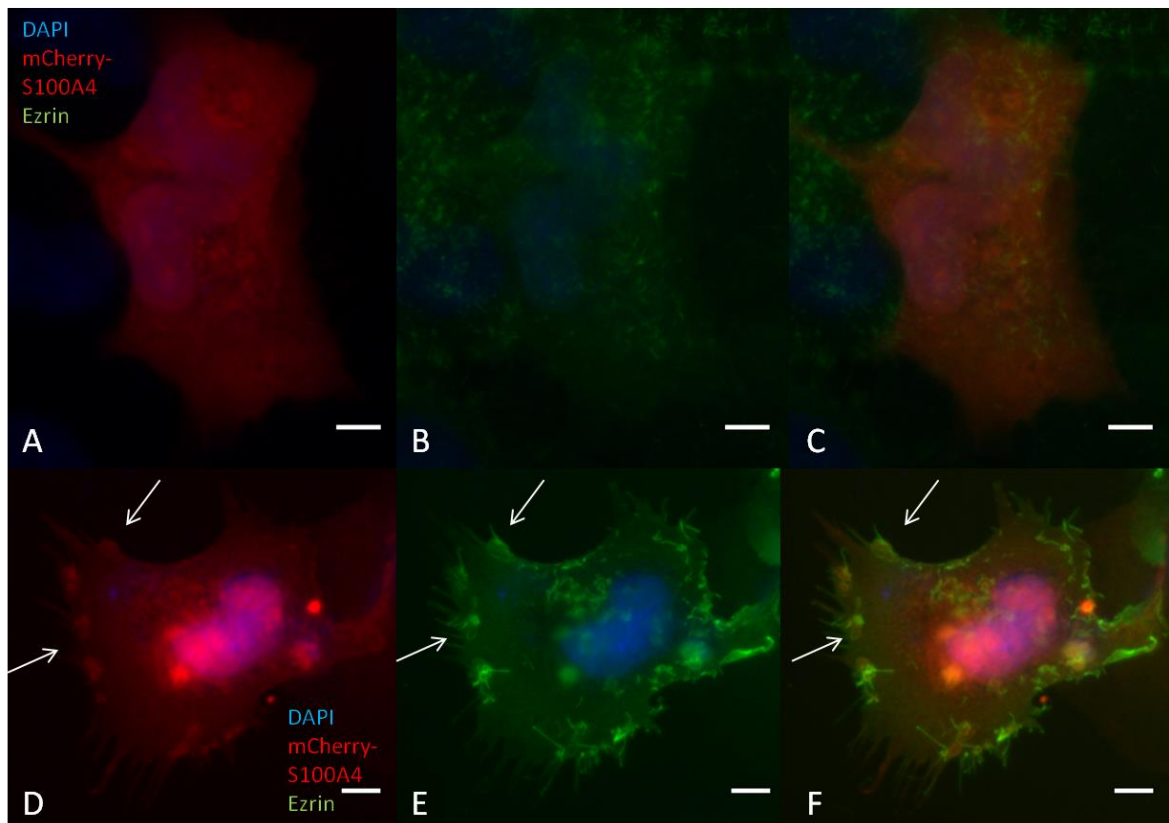


9. ábra: A431 sejtek mCherry-S100A4Ser Δ 13 fúziós fehérjét kódoló plazmiddal transzfektálva, ezrin Alexa-488 konjugált antitesttel jelölve.

A, B, C: EGF stimulus nélkül. A filopódiumok rövidebbek

D, E, F: EGF stimulust követően hosszú filopódiumokkal.

Kolokalizáció egyik esetben sem figyelhető meg.



10. ábra: A431 sejtek mCherry-S100A4 fúziós fehérjét kódoló plazmiddal transzfektálva, ezrin Alexa-488 konjugált antitesttel jelölve.

A, B, C: EGF stimulus nélkül. A filopódiumok rövidebbek

D, E, F: EGF stimulust követően hosszú filopódiumokkal.

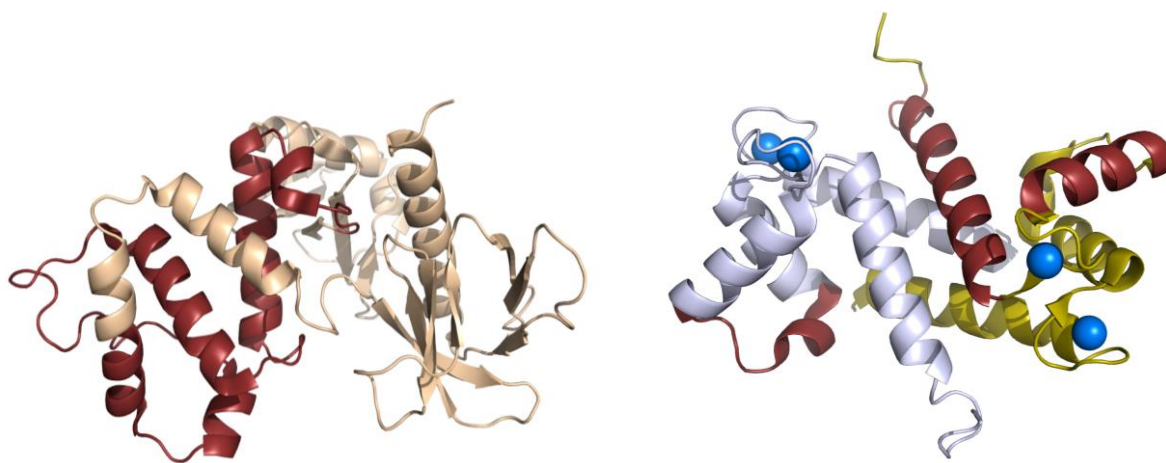
Kolokalizáció EGF-kezelést követően megfigyelhető.

ÖSSZEFOGLALÓ

A másodlagos tumorok a daganatos megbetegedések okozta halálozás 90%-áért felelősek¹. A metasztázisok molekuláris hátterének csupán töredéke feltárt. Az ezirányú kutatások jelentős része a tumorsejtek invazivitásának okát vizsgálják. Két lehetséges résztvevő, az ezrin és az S100A4 fehérjék kölcsönhatását vizsgáltam munkám során.

Az eredményeket összegezve elmondható, hogy az ezrin és az S100A4 *in vitro* kötődnek egymáshoz Ca^{2+} jelenlétében, sejtes rendszerben pedig kolokalizációt mutatnak EGF-kezelés hatására. A kötődés disszociációs állandója kb. 0,1-0,3 μM , amely hasonló az S100P-ezrin kölcsönhatás esetén mért 0,3 μM -hoz¹⁹.

A **11. ábrán** jelzem a fehérjék feltételezett kötőhelyeit, amennyiben feltételezzük, hogy az S100A4 és az S100P kötőhelye megegyezik az N-ERMAD-on¹⁹. A Nyitray-laboratóriumban végzett korábbi kísérletek alapján elmondható, hogy az S100A4 kötésért verseng az N-ERMAD és a nem-izom miozin IIA, tehát kötőhelyük feltehetőleg átfed az S100A4-en. Céljaink között szerepel a komplex kristályszerkezetének meghatározása.



11. ábra: **A:** N-ERMAD szerkezete, vörössel jelzett a régió, amelyen az S100A4 feltételezett kötőhelye található. **B:** Ca^{2+} -kötött S100A4 homodimer szerkezete, vörössel jelzett a NMIIA kötőhelye, mellyel az ezriné átfedhet.

(S100A4: PDB ID: 2Q91, N-ERMAD: PDB ID: 1NI2, az ábrák a PyMOL programmal készültek.)

A jövőben a kölcsönhatás biológiai jelentőségét célzó kísérletek elvégzésére lesz szükség. Terveink között szerepel a kötődést további módszerekkel alátámasztani, pl. Felületi Plazmon Rezonancia (SPR) méréssel, valamint meghatározni, hogy az ezrin-S100A4 kötődés milyen hatással van az ezrin-F-aktin kölcsönhatásra. Az S100P fehérjéhez hasonlóan⁴ feltételezhető,

hogy az S100A4 is elősegíti az ezrin aktív konformációjának kialakulását, ezzel elősegítve az F-aktin kötést (az itt nem bemutatott előkísérletek alátámasztják a feltételezésünket).

Ezen kívül szeretnénk további sejtes rendszerben (FRET módszerrel) kimutatni a kölcsönhatást. Végül migrációs tesztekkel ellenőrizhető, hogy a két fehérje kötődése kapcsolatba hozható-e az inváziós képességgel, ezen keresztül a metasztázisok kialakulásával. Amennyiben ez fennáll, a kölcsönhatás jellemzése alapot biztosíthat jövőbeli metasztázist célzó gyógyszerfejlesztések számára is.

MAGYAR ÉS ANGOL NYELVŰ REZÜMÉ

Az ezrin az ERM (ezrin, radixin, moezin) családhoz tartozó adapter fehérje, kapcsolatot teremt az F-aktin és a sejtmembrán között, ezáltal részt vesz az epitél sejtek kortikális aktin sejtváznak szervezésében. Az ezrin N-és C-terminálisa közötti intramolekuláris kölcsönhatás inaktív konformációt alakít ki, lefedve a fehérje kötőhelyeket. Aktív formában az ezrin N-terminális doménje membrán fehérjékhez köthet, míg C-terminális doménjén található az F-aktin kötőhely. Az ezrin számos tumoros sejt esetén túltermelődik, valamint feltehetőleg részt vesz a metasztázisok képződésében.

Az S100A4 a Ca^{2+} -kötő EF-kéz motívummal rendelkező S100 család tagja, szintén összefüggésbe hozható a másodlagos tumorok keletkezésével. Az S100A4, az ezrinhez hasonló módon, részt vesz a sejtvá szervezésében, szabályozza a sejtmotilitást a nem-izom miozin IIA-val való kölcsönhatása révén.

Az ezrin és S100A4 fehérjék közti kötődés kimutatását ELISA és *pull-down* technikával végeztük. A kölcsönhatás disszociációs állandójának meghatározásához triptofán fluoreszcencia mérést alkalmaztunk. A kötődést tumoros sejtvonalon is bizonyítottuk, A431 epiteliális karcinóma sejteken végzett kolokalizációs kísérlettel. Az A431 sejteket mCherry fluoreszcens fehérjével fuzionált vad típusú vagy mutáns S100A4-et kódoló plazmiddal transzfektáltuk, az endogén módon expresszált ezrint immunfestéssel jelöltük. Az ezrin és S100A4 fehérjék a metasztázis kialakulásához köthetőek, az interakciójuk jellemzésével új kezelési lehetőségekre nyílnak lehetőségek a jövőben.

Ezrin is an adapter protein that belongs to the ERM (ezrin, radixin, moesin) protein family and has a role in connecting the cortical F-actin to the cytoplasmic membrane, hereby ezrin participates in organizing the cortical F-actin cytoskeleton of epithelial cells. Intramolecular interaction between the N-and C-terminal domains of ezrin forms an inactive conformation that blocks protein-protein interaction sites. Unmasked N-and C-terminal domains of activated ezrin bind to the cytoplasmic membrane and F-actin, respectively. Overexpression of ezrin is common in a variety of cancer cells demonstrating an essential role of ezrin in forming secondary tumours.

S100A4 is a member of the Ca^{2+} -binding EF-hand S100 protein family and has been identified as a promoter of metastasis. S100A4, likewise ezrin, takes part in organizing the cytoskeleton, it regulates cell motility by interacting with non-muscle myosin IIA.

We demonstrated the interaction between ezrin and S100A4 by ELISA and pull-down assays. Additionally, we performed tryptophan fluorescence measurement to examine the dissociation constant of the interaction. Co-localization assay revealed an assumable binding between ezrin and S100A4 in A431 epithelial carcinoma cell line. A431 cells were transfected with plasmids encoding the mCherry fluorescent protein fused to S100A4 or mutant S100A4, endogenously expressed ezrin was visualized by immunostaining. Both ezrin and S100A4 has significant role in metastasis formation, thus characterizing their interaction might facilitate the development of novel antimetastatic therapies.