

36. OTDK

Biológia Szekció

**Az EHD1 fehérje új interakciós partnereinek
azonosítása az endoszomális rendszerben**

Horváth Enikő, Biológia Bsc III. év

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

Témavezető: Sőth Ármin

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék:

1. Absztrakt	3
2. Bevezetés	4
2.1. Az endoszomális rendszer működése	5
2.2. Pányvázó faktorok és komplexek	5
2.3. Az EHD fehérjék	6
3. Célkitűzések	8
4. Anyagok és módszerek	9
4.1. Klónozás	9
4.2. Élesztő két-hibrid technika	9
4.3. Sejtkultúra fenntartása	9
4.4. Transzfekció	10
4.5. Immunprecipitáció	10
4.6. Western-blot	11
4.7. Immuncitokémia	11
4.8. Mikroszkópia és képelemzés	12
5. Eredmények és megvitatásuk	13
5.1. Klónozás.....	12
5.2. Western blot és immunprecipitáció.....	13
5.2.1. Expresszió ellenőrzése	13
5.2.2. Anti-HA ko-immunprecipitáció	14
5.2.2. Anti-FLAG ko-immunprecipitáció.....	16
5.3. Élesztő két hibrid technika	17
5.4. Immuncitokémia	19
6. Diskusszió	20
Szerzői hozzájárulás	21
Köszönetnyilvánítás	22
Felhasznált irodalom	23

1. Absztrakt

Az EHD1 a reciklizációban kulcsfontosságú szerepet játszó fehérje, amelyet a FERARI pályvázó komplex részeként is leírtak. A pályvázó faktorok nélkülözhetetlenek a vezikulafúziós folyamatokban, melyekben önállóan (Rbsn-5) vagy komplexeket alkotva (CORVET és HOPS) vesznek részt.

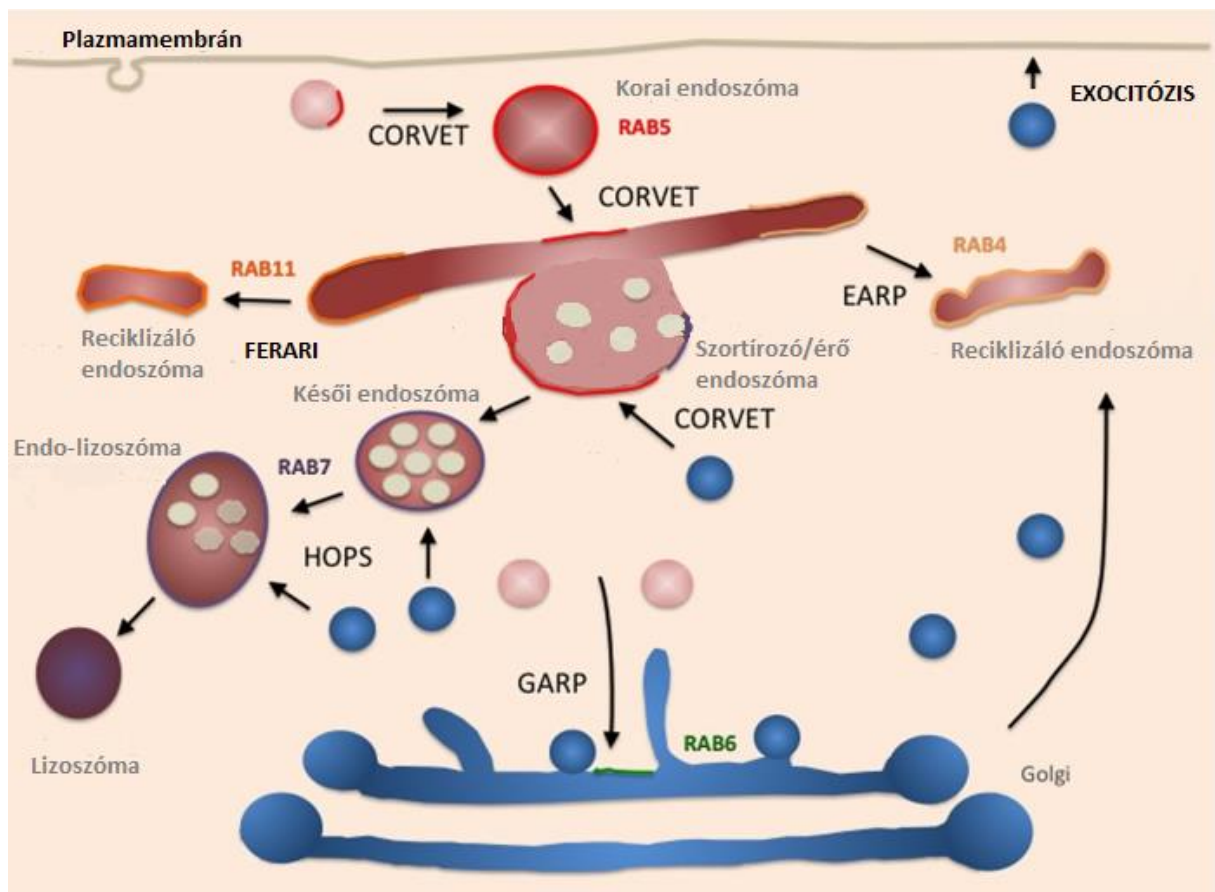
Kutatócsoportunk korábban bizonyította az Rbsn-5 és a Vps18 (a CORVET és a HOPS közös alegysége) közötti direkt kölcsönhatást. Továbbá a Rbsn-5 kölcsönhatást mutat a Vps45-tel, ráadásul részt vesz a reciklizációban az EHD1-el való kapcsolódása révén. Ezek tudatában vált számomra érdekessé a kérdés: kötődik-e az EHD1 a Vps18-hoz?

Céлом a különböző pályvázó faktorok, elsősorban az EHD1, kapcsolatainak felderítése a reciklizációban és a korai endoszomális rendszerben, valamint új lehetséges komplexek azonosítása.

Munkám során az EHD1 és a Vps18 közötti lehetséges kapcsolatot vizsgáltam. Ehhez a humán EHD1-et emlős expressziós vektorba klónoztam és HEK293 sejtekben termeltettem a fehérjét. Majd ko-immunprecipitációs kísérleteket végeztem, melynek eredményei alapján az EHD1 képes kötni mind a Vps18-at, mind a Vps45-öt. Mivel ko-immunprecipitációval a direkt és az indirekt kapcsolat is kimutatható, így élesztő két-hibrid rendszerben is teszteltem a kölcsönhatásokat. Az EHD1 csupán az Rbsn-5-tel mutatott kölcsönhatást, a Vps18-cal és a Vps45-tel nem. Ezen eredményeim az EHD1 és a Vps18 közötti közvetett kölcsönhatásra utalnak, amely feltételezhetően az Rbsn-5 kötés révén valósul meg.

2. Bevezetés

Az endoszomális-lizoszomális kompartmentum egy pontosan szabályozott és alapvető fontosságú, kiterjedt rendszer. Főbb feladata a sejt állandó fehérje- és lipidáramlásának fenntartása, az endocitózissal az intercelluláris térbe bekerülő anyagok fogadása, szortírozása és továbbítása (1. ábra). Ilyen internalizált anyagok lehetnek például fehérjék, peptidek, oldott anyagok, kórokozók (Solinger and Spang, 2013). Az endocitózis során a plazmamembrán egy része betüremkedik, aminek eredményeképpen membránnal határolt hólyagocskák, vezikulák jönnek létre. Azok az endocitotikus transzportfolyamatok, amelyeken a lefűződött vezikulákban az anyagok eljuthatnak az endoszómához többféleképpen lehetnek (klatrin-függő és –független vezikulák). Az endocitotikus anyagforgalomban a vezikulák útvonala erősen szabályozott a kis G-fehérjék családjába tartozó Rab-ok, az EH-domént C-terminálisan tartalmazó EHD (EH-domain containing proteins) fehérjék és pányvázó komplexek által (Zhang et al., 2012).



1. ábra - Pányvázó faktorok működése az endoszomális rendszerben, Spang A. (2016).
Membrane Tethering Complexes in the Endosomal System. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 4. alapián módosított ábra

2.1. Az endoszomális rendszer működése

A korai endoszómák elsődleges válogató állomásként működnek. Innen a lebontásra szánt anyagok az EHD4, Rab5 és rabenosyn-5 fehérjék közvetítésével a késői endoszómákba, majd a lizoszómákba szállítódnak. A Golgi-készülék felé lehetőség van retrográd transzport útján fehérjéket juttatni, aminek lebonyolításában az EHD3 és/vagy az EHD1 vesz részt. Az endocitózis során a plazmamembrán befűződés, vezikula képződés a membrán felületének csökkentését okozzák. Az endoszomális újrahasznosító útvonalak egyrészt ezt igyekeznek egyensúlyozni azzal, hogy a felvett fehérjék és lipidek nagy részét visszajuttatják a plazmamembránba (Grant & Donaldson, 2009). Ez a közvetlen transzportfolyamat, az úgynevezett gyors újrahasznosító útvonal (fast recycling), amelyhez a Rab4 szükséges. Létezik egy negyedik útvonal is, amely lassabb reciklizációt eredményez, hiszen itt az anyagok a plazmamembránhoz jutás előtt az ERC-be (endocytic recycling compartment) kerülnek a Rab5, Rab11, Rab8a valamint az EHD fehérjék segítségével (Naslavsky & Caplan, 2011). A Rab GTP-ázok és ezek effektor fehérjéi koordinálják a transzportfolyamatok útvonalainak kialakítását és a vezikulák célmembránhoz jutását. A Rab fehérjék úgynevezett molekuláris kapcsolóként működnek, miközben a GTP-hez kötött aktív állapot és a GDP-hez kötött inaktív állapot között váltakoznak (Kaur & Lakkaraju, 2018). A Rab5 szabályozza az endocitotikus vezikulák fúzióját a korai endoszómákkal (EE). Így a Rab5 egyrészt a kezdetektől jelen van az EE érésének különböző szakaszaiban, másrészt a késői endoszómává való átalakulás fő szabályozója. (Huotari & Helenius, 2011). A korai endoszómákhoz kapcsolt Rab4 faktor szükséges a gyors reciklizáció lezajlásához, szabályozza a membrántranszportot és transzferrin receptor újrahasznosítását (McCaffrey et al., 2001). A Rab7 az előzőekkel ellentétben a késői endoszomális kompartment markere, annak szabályozója. A Rab11 az EHD1 és EHD3 EH-doménjéhez kötődve, szabályozza a lassú reciklizáció során a transzportot a korai endoszómából az ERC-be. A membránok összeolvadásáért a SNARE komplexek felelősek, valamint szerepet játszanak a donor-és célmembrán azonosításában is. A vezikula membránjában a vSNARE, a célmembránban a tSNARE fehérjék lokalizáltak. Ezek egymást felismerve, összekapcsolódva egy transz-SNARE komplexet hoznak létre. A kapcsolódás következtében a membránok egymást szorosan megközelítik, majd ezután más fúziós fehérjékkel együttműködve megtörténhet a vezikula összeolvadása a célmembránnal.

2.2. Pányvázó faktorok és komplexek

A pányvázó fehérje komplexek többnyire a célmembránon lokalizáltak, onnan mintavételezik a környezetet megfelelő vezikulákat keresve. Sikeres kapcsolódás esetén

megfelelő közelségbe húzzák a membránokat, hogy azok fuzionálhassanak egymással (Yu & Hughson, 2010). Ezek a komplexek segítenek abban, hogy gyorsabban és hatékonyan végbemehessen az intracelluláris transzport, illetve a megfelelő membránok összeolvadása történjen meg. A Rabenosyn-5 egy olyan pányvázó faktor, amely önmagában és komplexek alegységeként is képes működni. A Rab5-höz, a Rab4-hez és az EHD1-hez is kötődik, így képes összekapcsolni ezeket a doméneket a korai endoszómában, ahol ezzel összehangolhatja a szortírozást a gyors újrahasznosítással (Jovic et al., 2010).

A korai endoszomális rendszer jellegzetes pányvázó komplexe a CORVET (class C core vacuole/endosome tethering), míg a késői endoszomális és lizoszomális rendszer megfelelő működésében a HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) vesz részt. Mindkettő hat alegységből felépülő pányvázó komplex, melyeket élesztőben írták le először. A komplexek hat alegységből négy közös (Vps11, Vps16 Vps18 és Vps33), valamint további két specifikus alegységük van, mely a CORVET esetében a Vps3 és a Vps8, a HOPS esetében a Vps39 és a Vps41. A CORVET szükséges ahhoz, hogy az endoszóma-endoszóma fúzió létrejöhessen a Rab5 megkötésén keresztül (Balderhaar & Ungermann, 2013). Specifikus alegységei, a Vps3 és a Vps8 részt vesznek az integrinek szállításában a korai endoszómáktól az újrahasznosító endoszómáig (van der Beek et al., 2019). A HOPS alegységeit megvizsgálva leírták, hogy a Vps41 közvetíti a lizoszomális membránfehérjék transzportját a transz Golgi hálózattól (TGN) az endoszómákba (van der Beek, et al., 2019), míg a Vps39 a késői endoszóma-lizoszóma fúzióban és az autofagoszómák/lizoszómák összekapcsolásában játszik szerepet (Iaconis et al., 2020). A HOPS és a CORVET mellett egy harmadik komplexet is leírtak, ez a FERARI (Factors for Endosome Recycling And Retromer Interaction) néven elnevezett pányvázó komplex. A FERARI az előző két ismertett komplexhez képest eltérő alegységeket (VIPAS39, rabenosyn-5, ANK3, Rab11FIP5), illetve EHD1 fehérjét és Vps45-öt tartalmaz. Kísérletekkel igazolták, hogy a FERARI emlős sejtekben Rab fehérjéket tartalmazó membránokat köt össze, így például elengedhetetlen szerepet játszik a Rab11 függő reciklizációs útvonal működésében (Solinger et al., 2020). Az EHD1 lehetővé teszi, hogy membránfúzióra és membránhasításra is egyaránt képes legyen a komplex, míg a Vps45 biztosítja a SNARE komplexekkel való interakciót.

2.3. Az EHD fehérjék

Az EHD fehérjék az endocitotikus transzportfolyamatok fontos szabályozóiként váltak ismertté. A legtöbb interakciót az EH doménjükkel alakítják ki az interakciós partner fehérje NPF motívumához kapcsolódva (Naslavsky & Caplan, 2011). Ezek a fehérjék mind a Rab

effektorokkal való kapcsolódásuk révén végzik el a különböző feladataikat a szállítási útvonalakban. Az EHD1-nek *Caenorhabditis elegans*ban megfeleltethető fehérje az Rme-1, a *Drosophila melanogaster* modellállatban lévő ortológja a Past-1. Emlős sejtek esetében a korai endoszomális rendszerben több, különböző EHD fehérjét is megtalálhatunk (EHD1, EHD2, EHD3, és EHD4), melyek egy adott transzport folyamatban vehetnek részt. Ezáltal ugyanis lehetővé válik, hogy egyes faktorok esetleges funkcióvesztése esetén mások bizonyos mértékben átvegyék szerepüket. Az EHD1 funkciói közé tartozik a transferrin receptorok, GLUT-4 glükóz transzporterek, β 1 integrinek, MHC-I molekulák újrahasznosítása plazmamembrán felé, illetve a lassú reciklizáció szabályozása (Naslavsky & Caplan, 2011). Így az EHD1 működésének hibája kulcsfontosságú receptorok, fehérjék nem megfelelő szállításához, ezáltal azok funkcióvesztéséhez vezethet. Kísérletesen bizonyították, hogy az EHD1 a GLUT4 tartalmú vezikulák normál megkötéséhez és szállításához szükséges transzportrendszer része, hiszen EHD1 nélkül nem volt megfelelő ezeknek a vezikuláknak a plazmamembránhoz jutása (Guilherme et al., 2004). Továbbá a ferlin-EHD által közvetített vezikuláris transzport szabályozza a T-tubulusok szintézisét és fenntartását, ami elengedhetetlen az izomnövekedéshez. Az EHD1 hiányában a kísérletben alkalmazott egerek vázizmaiból hiányoztak egyes izomrostok és csökkent az izomtömegük (Posey et al., 2014). Továbbá az EHD1 szükséges ahhoz, hogy az EGFR (epidermal growth factor receptor) a reciklizáció során a Golgi készülékből visszakerüljön a sejtfelszínre (Tom et al., 2020). Mindezek alapján látható, hogy az EHD1 normál működése számos sejtbiológiai folyamathoz elengedhetetlen, mint például az antigén prezentáció, a sejtmigráció, és a jelátvitel.

Már korábban is ismert volt, hogy az EHD1 kapcsolatban áll a rabenosyn-5 effektor fehérjével (Naslavsky et al., 2004), munkacsoportunk pedig nemrégiben kimutatta a Vps18 és a rabenosyn-5 interakcióját (Simon-Vecsei et al., 2021). Ezek után vált számomra érdekessé az EHD1 fehérje új interakciós partnereinek azonosítása az endoszomális rendszerben.

3. Célkitűzések

Fő célom az EHD1 fehérje és különböző pányvázó faktorok közötti kapcsolat kimutatása HEK293 humán sejtes modellben, valamint élesztő két-hibrid rendszerben. Munkám során szerettem volna megtudni, hogy kötődik-e az EHD1 fehérje a FERARI komplex részeként a CORVET és HOPS komplexben található Vps18 alegységhez.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Klónozás

Élesztő két-hibrid kísérletekhez az EHD1, Rbsn-5, Vps18 és Vps45 fehérjéket kódoló szekvenciákat HeLa cDNS-ből amplifikáltuk PCR technikával, majd pGADT7 AD (aktiváló domén) és pGBKT7 BD (kötő domén) vektorok következő hasítóhelyeire klónoztuk NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs) felhasználásával: EcoRI-XhoI, illetve EcoRI-NotI. A humán sejtek transzfekciójához a teljes hosszúságú fehérjéket CMV promoterral rendelkező, N-terminális HA- és FLAG-címkéket kódoló vektorok EcoRI-SalI hasítóhelyeire klónoztuk (Mórocz et al, 2017). A szekvenciákat restriktációs hasítással, majd Sanger-féle DNS szekvenálással (Microsynth) ellenőriztük.

4.2. Élesztő két-hibrid technika

A sikeres klónozás után AH109 élesztőtörzset 250µl DNS-el (Frozen EZ Yeast Transformation III, ZYMO Research) transzformáltunk, reakciónként és plazmidonként. Az EHD1 és Vps18 valamint Vps45 kapcsolatánál az élesztőket AD-Rbsn-5+BD-EHD1, EHD1-AD+Vps45-BD, Vps18-AD+EHD1-BD plazmid kombinációkkal transzformáltuk. Az első kombinációt használtuk kontrollként. Az élesztőket 3 féle lemezre cseppentjük ki: SD-WL (SD: synthetic defined), triptofán (W) és leucin (L) mentes, valamint SD-WLA (adenint (A) sem tartalmazó), SD-WLH (hisztidin mentes) táptalajokra. A spot assay-hez spektrofotométerrel 595 nm-en meghatároztuk az egyes transzformált élesztők abszorbanciáját, majd a kultúrákat OD1 értékre állítottuk be, melyekből 10-10µl –t vittünk fel a lemezekre. Az élesztőket 30°C-on 48 órán át inkubáltuk minden esetben.

4.3. Sejtkultúrák fenntartása

A HEK 293 (human embryonic kidney) sejteket T25-ös letapadást biztosító flaskában, 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük. A felhasznált tápfolyadék: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza) + 10%FBS (Lonza) + 1% penicillin-streptomycin (10000U/ml, Lonza) + 1% L-glutamin (200mM, Lonza). HeLa sejteket is használtunk, hiszen ezeknek a sejtek jobban bírják az immuncitokémia eljárással járó stresszt. A HeLa sejtek esetében is azonos protokollokat használtunk, mint a HEK sejtek esetében.

4.4. Transzfekció

A western-blot és immunprecipitációs eljárásokhoz: megszámloltuk Bürker-kamra segítségével a sejteket, majd T25-ös flaskába 1,8 millió HEK293 sejtet raktunk ki. 24 óra elteltével transzfektáltuk őket. A transzfekció TransIT-LT-1 (Mirus) reagenssel történt, követve a gyártó utasításait. Flaskánként 2500ng plazmid konstrukciót és 7,5µl reagenst használtunk. A plazmidokat és a transzfektáló reagenst külön összemértük OPTI-MEM médiummal, majd a kettőt összekeverve, 30 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után adtuk a sejtekhez. A transzfekciót Vps18-FLAG, Vps45-FLAG, EHD1-HA és Rbsn-FLAG plazmidokkal végeztük. 24 órával a transzfekció után készítettünk a sejtekből fehérje mintát.

Az immuncitokémiához: HEK 293, illetve HeLa sejteket 8 kamrával fedett, letapadó sejtek számára bevonattal ellátott tárgylemezekre (Thermo Scientific) raktuk ki. Nyolcvanezer sejtet helyeztünk ki minden lemez minden kamrájába, melyeket Bürker-kamra segítségével számloltunk le. A transzfekciót 24 órával a kirakás után végeztük, a fentebb említett plazmid konstrukciókkal. A transzfektáló oldatot ugyanúgy készítettük, mint az előző esetben. 100ng plazmid konstrukciót adtunk egy lemez egy kamrájához.

4.5. Immunprecipitáció

24 órával a transzfekció után a sejteket felkapartuk jégen, hideg PBS-sel (phosphate buffer saline) mostuk, majd 6000g 5 perc 4°C-os centrifugálással üleptítettük. 500µl lízis pufferben (50mM TRIS-HCl, pH: 7,5, 150mM NaCl, 1% Tritonx100, 5mM EDTA, 1mM PMSF (Sigma)) felszuszpendáltuk, majd 30 percig jégen inkubáltuk a sejteket. 5 percig 4°C-on 20000g-vel centrifugáltunk. A felülúszóból INPUT mintákat vettünk, egyenként 40µl-t. A felülúszóhoz adtunk 20µl anti-FLAG gyöngyöt (Sigma), illetve a másik alkalommal 20µl anti-HA gyöngyöt (Sigma). Ezt 1,5 órán át 4°C-on forgattuk. Ezután 5 perc centrifuga 5000g-vel 4°C-on és 15 perc forgatás következett 4°C-on a mosó pufferrel (a lízis pufferrel megegyező, de nem tartalmaz proteáz inhibitor). A mosást háromszor ismételtük. Az utolsó mosást követően, a gyöngyökhöz 20 µl mosó puffert és 8 µl 6xLaemmli puffert adtunk, majd 100°C-on 5 percig forraljuk, az INPUT mintákat is. Egyik alkalommal anti-HA agaróz gyöngyökkel húztuk ki a FLAG címkével jelölt fehérjeinket, míg a másik alkalommal anti-FLAG agaróz gyöngyökkel húztuk ki a HA címkés fehérjeinket. Ezután western-blottal vizsgáltuk a mintákat.

4.6. Western-blot

A transzfektált sejtekből fehérje mintákat készítettünk. Flaskánként 5 ml hideg PBS-sel mostuk a sejteket jégen. Majd 250 µl lízis puffert (50mM TRIS-HCl, pH: 8, 50mM KCl, 1% Tritonx100, 10mM EDTA, 1mM PMSF (Sigma)) adtunk egy flaska sejthez és ebben 16 percig inkubáltuk őket jégen. Ezután jégen felkapartuk a sejteket, majd 8 percig 4°C-os 30000g-s centrifugálással ülepítettük őket. A felülúszót új csőbe tettük, melyből 5 µl-t, minden mintából, 1ml Bradford reagensbe (Thermo Scientific) mértünk, 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd spektrofotométerrel 595 nm-en lemértük az oldatok abszorbanciáját. A minták koncentrációit szarvasmarha szérumalbuminnal (BSA-val) meghatározott kalibrációs egyenessel és a kapott abszorbancia értékekkel számítottuk ki. A minták többi részét 6xLaemli pufferrel 5 percig 100°C-on forraltuk. A 10% -os SDS poliakrilamid gélre 20 µg fehérjét tartalmazó mintát vittünk fel zsebenként. Az elektroforézist standard körülmények között 25 mA/gél áramerősség mellett végeztük, majd a fehérjéket PVDF membránra transzferáltuk. Egérben termeltetett anti-FLAG (Sigma, M2, hígítás: 1:2000), anti-tubulin (DSHB, hígítás: 1:800), patkány anti-HA (Roche, hígítás: 1:1000) és nyúl anti-Rbsn-5 (Proteintech, hígítás: 1:2000) elsődleges antitesteket használtunk. Másodlagos antitestként torma peroxidáz enzimmal konjugált anti-egér (1:10000 hígításban) és anti-patkány (1:4000 hígításban) ellenanyagokat használtunk. A fehérjék kimutatásához a torma peroxidáz szubsztrátját alkalmaztuk (Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) a jelet géldokk rendszerrel detektáltuk.

4.7. Immuncitokémia

A transzfekció után 24 órával kezdtük el az immuncitokémiát. Az inkubáció szobahőmérsékleten történt, ha másként nem említjük. A sejteket 8 kamrára osztott, letapadást segítő anyaggal kezelt tárgylemezre raktuk ki, 80000 sejt/kamra arányban. Minden anyagot 500µl/kamra mennyiségben használtunk, kivéve az antitesteket, azokat 200 µl/kamra mennyiségben alkalmaztuk. A sejteket mostuk PBS-sel, majd 4%-os formalinnal fixáltuk őket 15 percig. Ezt követte 15 perc mosás PBS-glicinnel, 15 perc permeabilizálás 0,1%-os Tritonnal PBS-glicinben és 30 perc blokkolás. A blokkoló oldat: PBS-glicin + 1% BSA (bovine serum albumin), ebben hígítottuk az antitesteket is. A mintákat az elsődleges antitesttel inkubáltuk 1 órán keresztül. Elsődleges antitestként patkányban termeltetett anti-HA (Roche, 1:100) és nyúlban termeltetett anti-Rbsn-5 (Proteintech, 1:200), ellenanyagokat használtunk. Ezt követően intenzíven mostuk PBS-glicinnel-el, majd 15 percig PBS-glicin + 4% NaCl-el inkubáltuk. Megismételtük a PBS-glicines mosást, majd 1 óráig inkubáltuk a másodlagos

antitesttel. A másodlagos antitestek számárban termeltetett Alexa Fluor 568 (Thermo Scientific) anti-nyúl és Alexa Fluor 488 anti-patkány (Thermo Scientific), mindkettőt 1:600 hígításban alkalmaztuk. Ezt követően 15 perc inkubálás PBS-glicin + 4 % NaCl, majd 15 perc PBS-glicin+ Hoechst sejtmagfestéssel (1:200 hígításban). Végül 15 perc mosás PBS-glicinnel. A tárgylemezről eltávolítottuk a kamrákat és minden kamra helyére 5 µl Vectashield mounting mediumot (Vectar laboratories) cseppentettünk és fedőlemezrel fedtük.

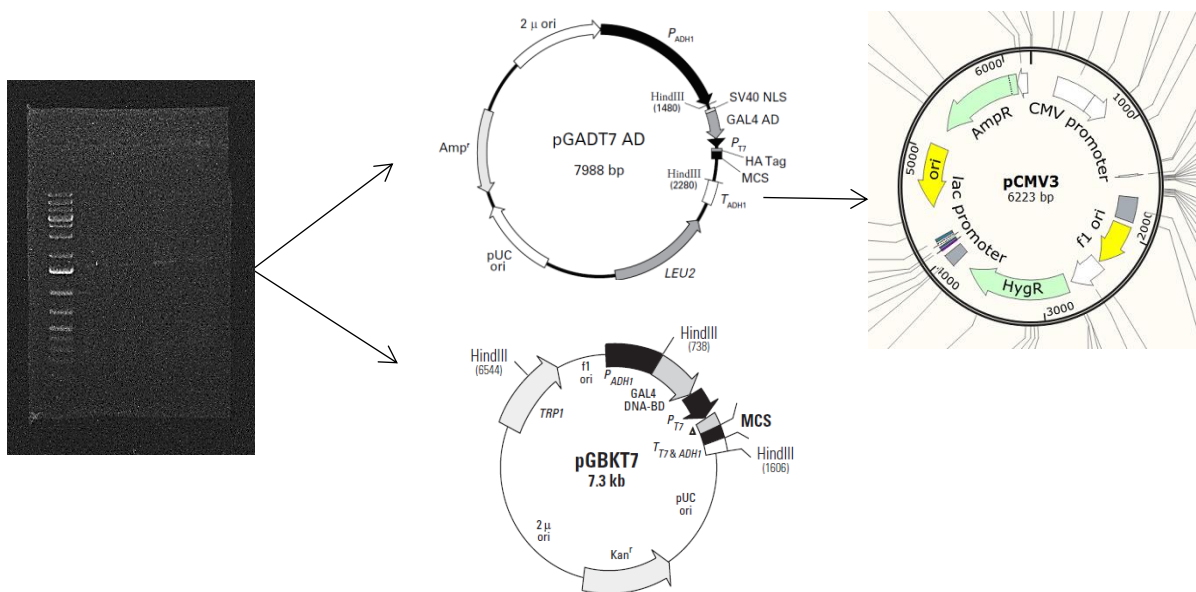
4.8. Mikroszkópia és képelemzés

A mintákat Zeiss Axioskop2-MOT epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és az AxoVision szoftver segítségével készítettünk képeket.

5. Eredmények és megvitatásuk

5.1. Klónozás

Az EHD1 fehérjét HeLa sejtekből történő mRNS izolálás és cDNS szintézis után többszöri PCR reakcióval sikerült felszaporítani. A kapott terméket tisztítás után NEBuilder reakcióval megfelelő restrikciós enzimmel hasított pGADT7 és pGBKT7 vektorokba illesztettük. Majd a HA és myc címkéket tartalmazó vektorokból a pCMV emlős expressziós vektorba szubklónoztuk (1. ábra). A Vps18-FLAG, Vps45-FLAG, Rbsn-FLAG konstrukciók korábbról rendelkezésre álltak.

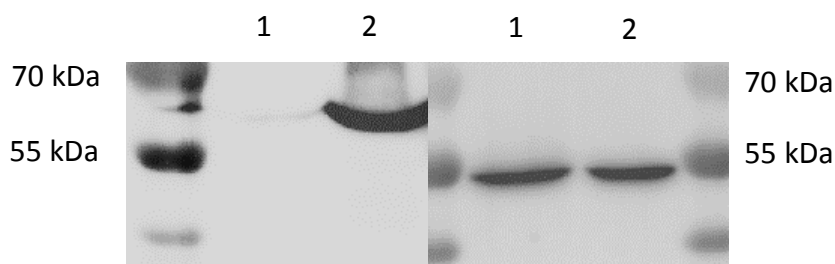


2. ábra – Az EHD1 fehérje felszaporítása után, pGADT7 és pGBKT7 vektorokba illesztése, majd pCMV emlős expressziós vektorokba inszertálása

5.2. Western blot és immunprecipitáció

5.2.1. Expresszió ellenőrzése

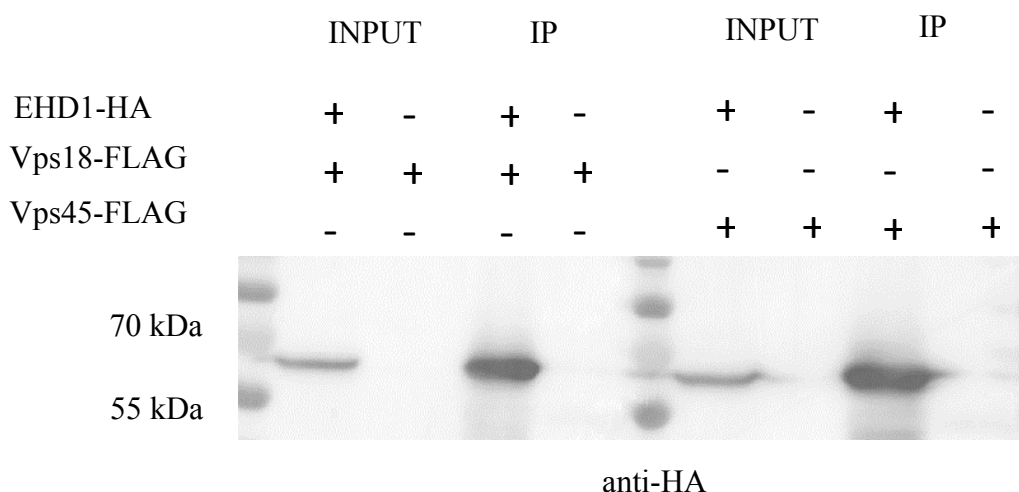
Először az EHD1-HA konstrukciónkkal transzfektáltuk a sejteket, majd 24 óra elteltével fehérje mintát készítettünk belőlük. Western blottal ellenőriztük a konstrukciónk expresszióját a kontroll, vad típusú sejtekhez hasonlítva (3. ábra). A Vps18-FLAG, Vps45-FLAG, Rbsn-FLAG konstrukciók már korábbról rendelkezésre álltak. Azonos, 20μg fehérjét futtatva látható, hogy 24 óra elteltével megfelelően expresszált a fehérje konstrukciónk.



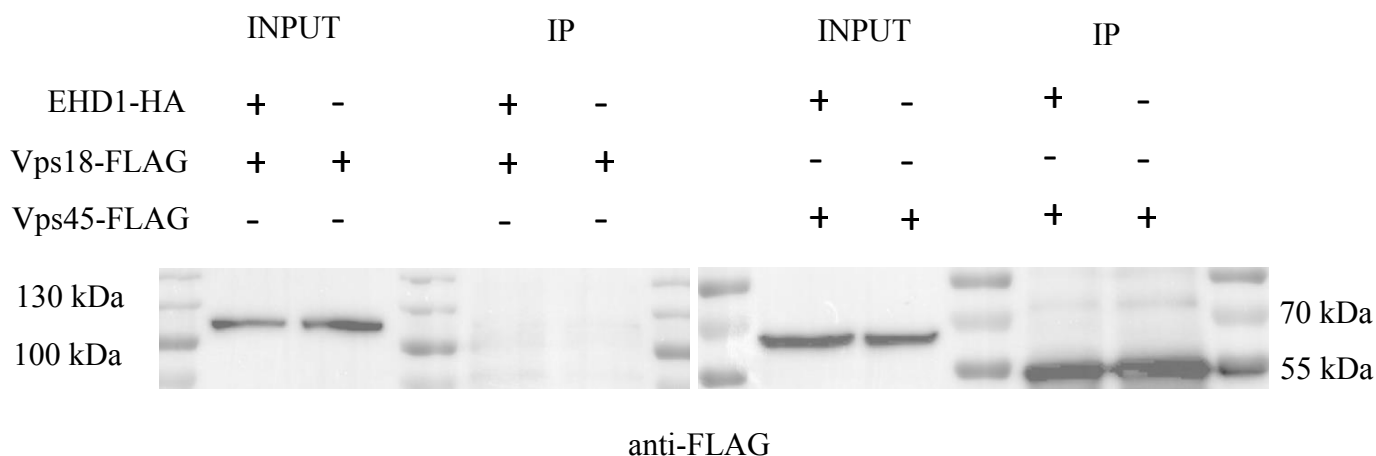
3. ábra – A fehérje konstrukció expressziójának ellenőrzése bal oldalon HA-címkére, jobb oldalon a tubulinra hívva, 1: HEK-CMV, 2: HEK-CMV-EHD1

5.2.2. Anti-HA ko-immunprecipitáció

A fehérje-fehérje közötti interakciók kimutatására ko-immunprecipitációt (koIP) alkalmaztunk, amely során HEK293 sejteket transzfektáltunk a Rbsn-5, Vps45, Vps18 HA és FLAG címkével ellátott változataival. A Rbsn-5 110 kDa, a Vps18 110 kDa, a Vps45 62 kDa, az EHD1 60 kDa molekulatömegű. Az első két minta az INPUT-ból, a második kettő az immunprecipitációból lett véve mindegyik esetben. A +/- jelek azt mutatják, hogy az adott minta transzfektálva volt-e a különböző konstrukciókkal vagy sem. Először anti-HA gyönggyel végeztünk immunprecipitációt, mely után western bloton anti-HA (4. ábra) és anti-FLAG (5. ábra) ellenanyaggal detektáltuk a fehérjéket.



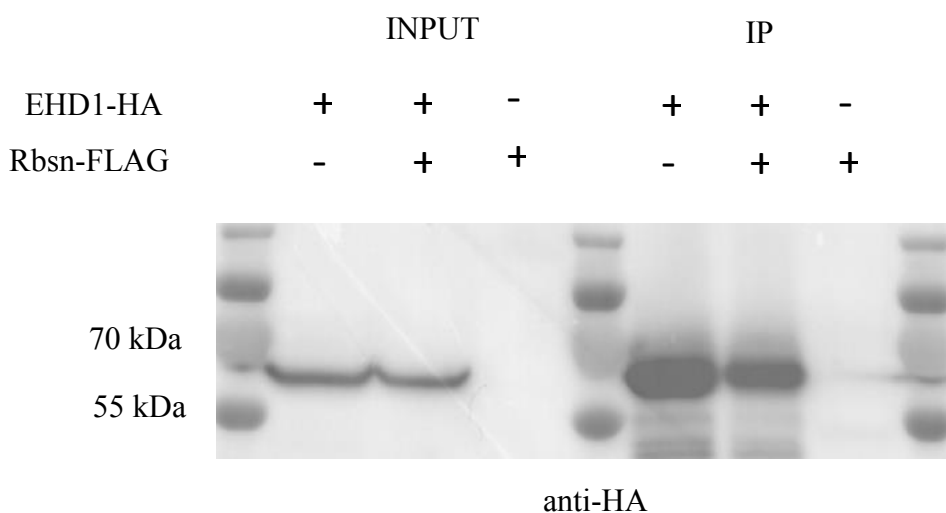
4. ábra – Az anti-HA ko-IP utáni western blot, bal oldalon a Vps18-FLAG-et tartalmazó minták, jobb oldalon a Vps45-FLAG-et tartalmazó minták



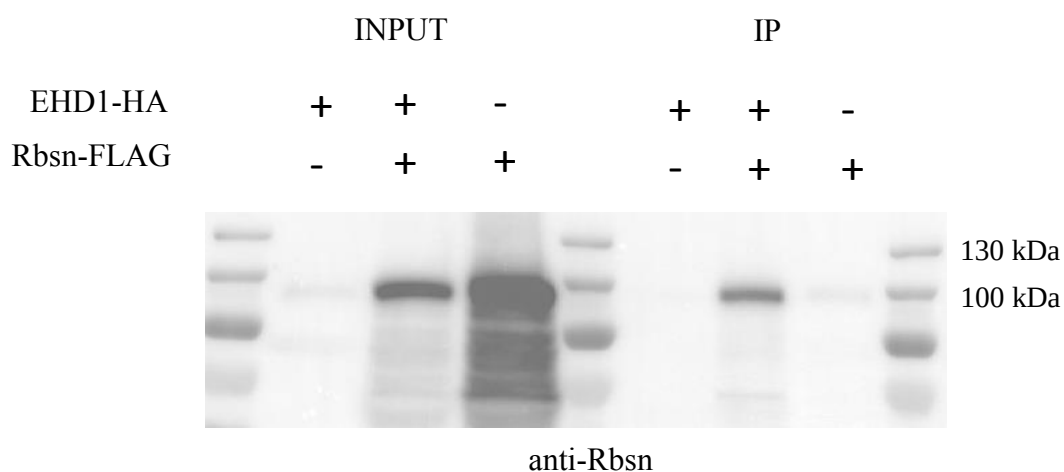
5. ábra – Az anti-HA ko-IP utáni western blot, bal oldalon a Vps18-FLAG-et tartalmazó minták, jobb oldalon a Vps45-FLAG-et tartalmazó minták

Az EHD1 nem mutatott interakciót a Vps18-cal, sem a Vps45-tel. A Vps45-tel való kölcsönhatás hiánya azért is érdekes, mivel a két fehérje egy komplexben szerepel, viszont ezt magyarázhatja a Vps45-FLAG alacsony expressziója.

Ezután megvizsgáltuk, hogy az EHD1 képes-e immunprecipitációban ismert kötőpartnerét, a Rbsn-t kihúzni. Ehhez szintén HEK293 sejteket transzfektáltunk EHD1-HA és Rbsn-FLAG konstrukciókkal. Majd anti-HA gyönggyel végeztünk immunprecipitációt és western bloton anti-HA (6. ábra) és anti-Rbsn (7. ábra) ellenanyagokkal detektáltuk a fehérjéket.



6. ábra – Az anti-HA ko-IP utáni western blot, anti-HA ellenanyaggal detektálva az EHD1 fehérje

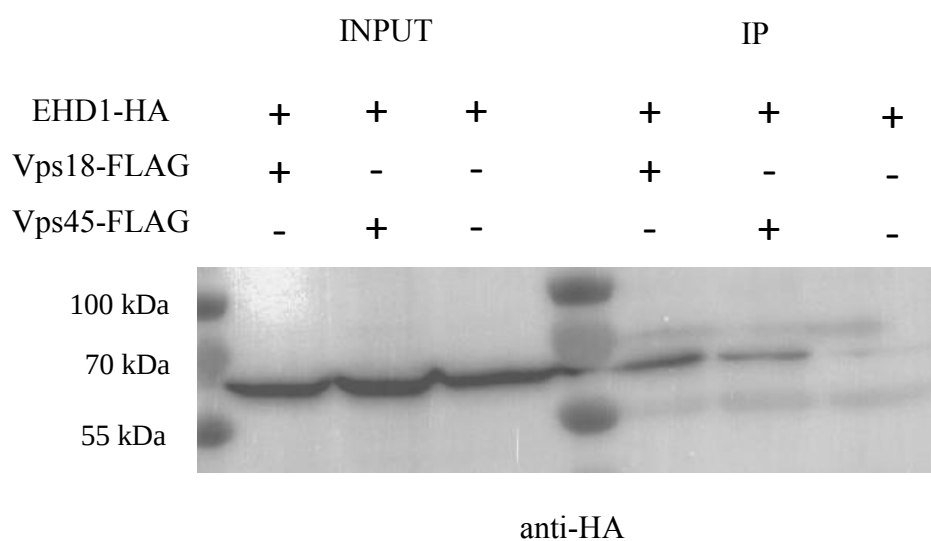


7. ábra – Az anti-HA ko-IP utáni western blot, anti-Rbsn ellenanyaggal detektálva a Rabenosyn-FLAG fehérje

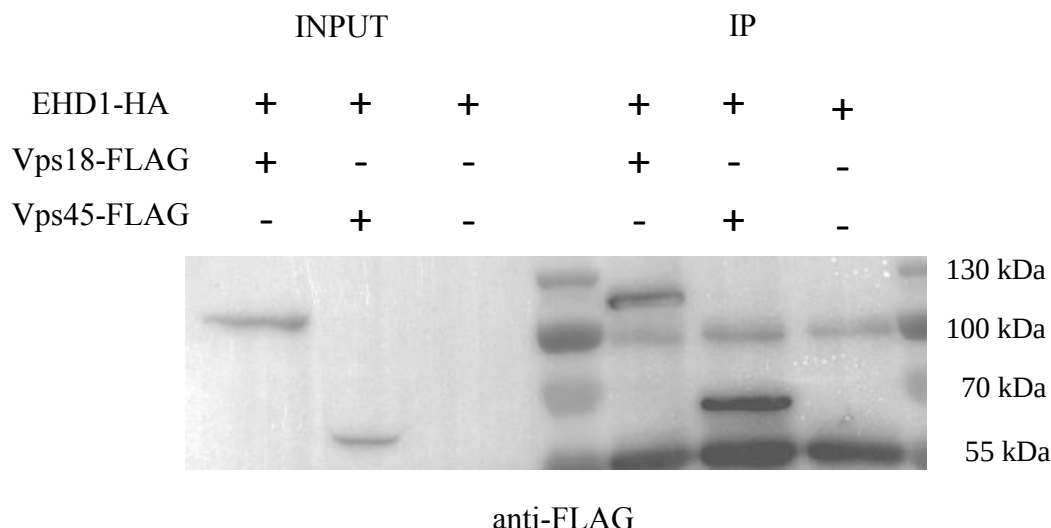
Az EHD1 ki tudta húzni közvetlen kötőpartnerét a Rbsn-t. Ebből megállapítható, hogy az EHD1 konstrukciónk nem csak megfelelően expresszál, de képes megfelelő fehérje-interakciók kialakítására

5.2.3. Anti-FLAG ko-immunprecipitáció

Ezek után megvizsgáltuk a lehetséges kölcsönhatást a másik irányból. Anti-FLAG gyönggyel végeztünk immunprecipitációt az EHD1-HA és Vps18-FLAG, illetve EHD1-HA és Vps45-FLAG konstrukciókkal transzfektált sejteken. Western bloton anti-HA (8. ábra) és anti-FLAG (9. ábra) ellenanyagokkal detektáltuk a fehérjéinket.



8. ábra – Az anti-FLAG ko-IP utáni western blot, anti-HA ellenanyaggal detektálva az első oszlopban a Vps18-FLAG-et tartalmazó mintákat, a második oszlopban a Vps45-FLAG-et tartalmazó mintákat. A harmadik oszlop kontrollként szerepel

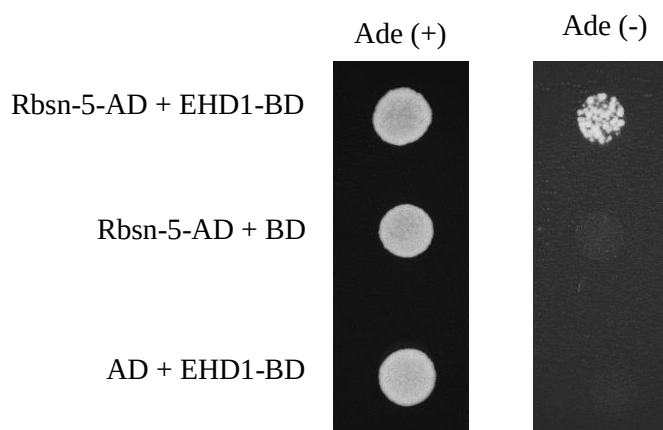


9. ábra – Az anti-FLAG ko-IP utáni western blot, anti-FLAG ellenanyaggal detektálva az első oszlopban a Vps18-FLAG-et tartalmazó mintákat, a második oszlopban a Vps45-FLAG-et tartalmazó mintákat. A harmadik oszlop kontrollként szerepel.

Az anti-FLAG immunprecipitáció során azt tapasztaltuk, hogy mind a Vps18, mind a Vps45 képes kihúzni magával interakciós partnerét, az EHD1-t.

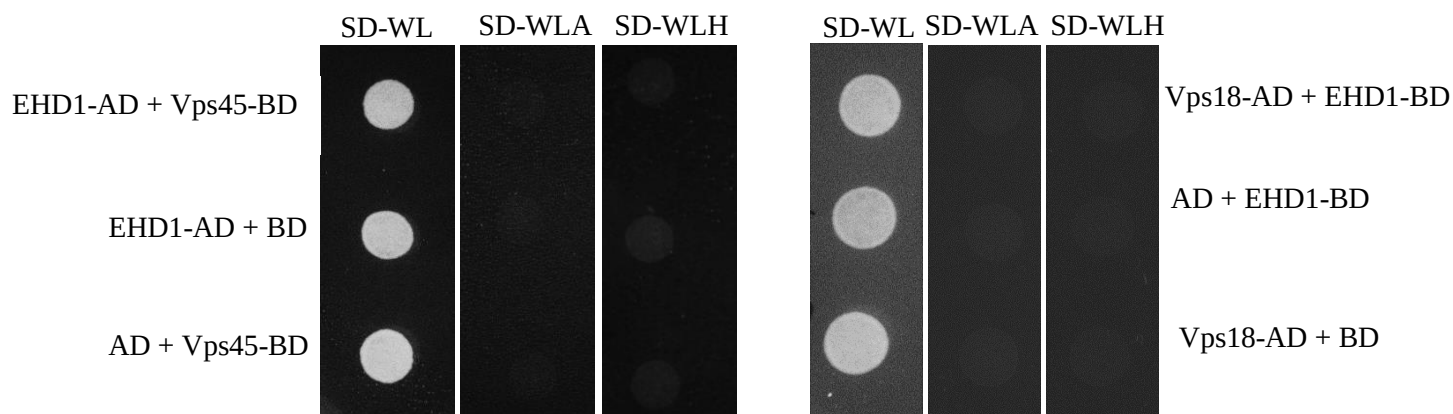
5.2. Élesztő két hibrid rendszer

A ko-immunprecipitációs kísérletek után élesztő két-hibrid rendszerben is megvizsgáltuk a lehetséges interakciókat. Az immunprecipitációs eljárásokkal mind a direkt, mind az indirekt kölcsönhatás kimutatható, viszont az élesztő két-hibrid módszerrel kizárólag a direkt kölcsönhatásokat lehet detektálni. Az SD-WL (triptofán és leucin mentes) táptalajon az élesztő képes lesz szintetizálni ezeket az aminosavakat, növekedni fog, amennyiben felvette a mindkét hozzáadott vektort (pGADT7 AD és pGBKT7 BD). Ez a szelektív táptalaj ellenőrzésül szolgálhat, arra hogy bekerült-e a vektor vagy sem. Az SD-WLA esetében az előző két aminosav mellett az adenin is hiányzik, ebben az esetben csak akkor tud növekedni az élesztő, ha van direkt kölcsönhatás a vizsgált két fehérje között. Az adenin hiányos táptalajon csak a Rbsn-5-öt és az EHD1 fehérjét expresszáló élesztőtörzsek esetében tapasztaltunk növekedést, a kontroll reakciónál negatív eredményt kaptunk (10. ábra). Következtetésképp a humán Rbsn-5 és az EHD1 közvetlenül kapcsolódik egymáshoz.



10. ábra – Szelektív táptalajon végzett élesztő két hibrid kísérlet. Ade (+): az adenint tartalmazó táptalaj, Ade (-): adenin hiányos táptalaj, AD: aktivátor domén, BD: kötő domén

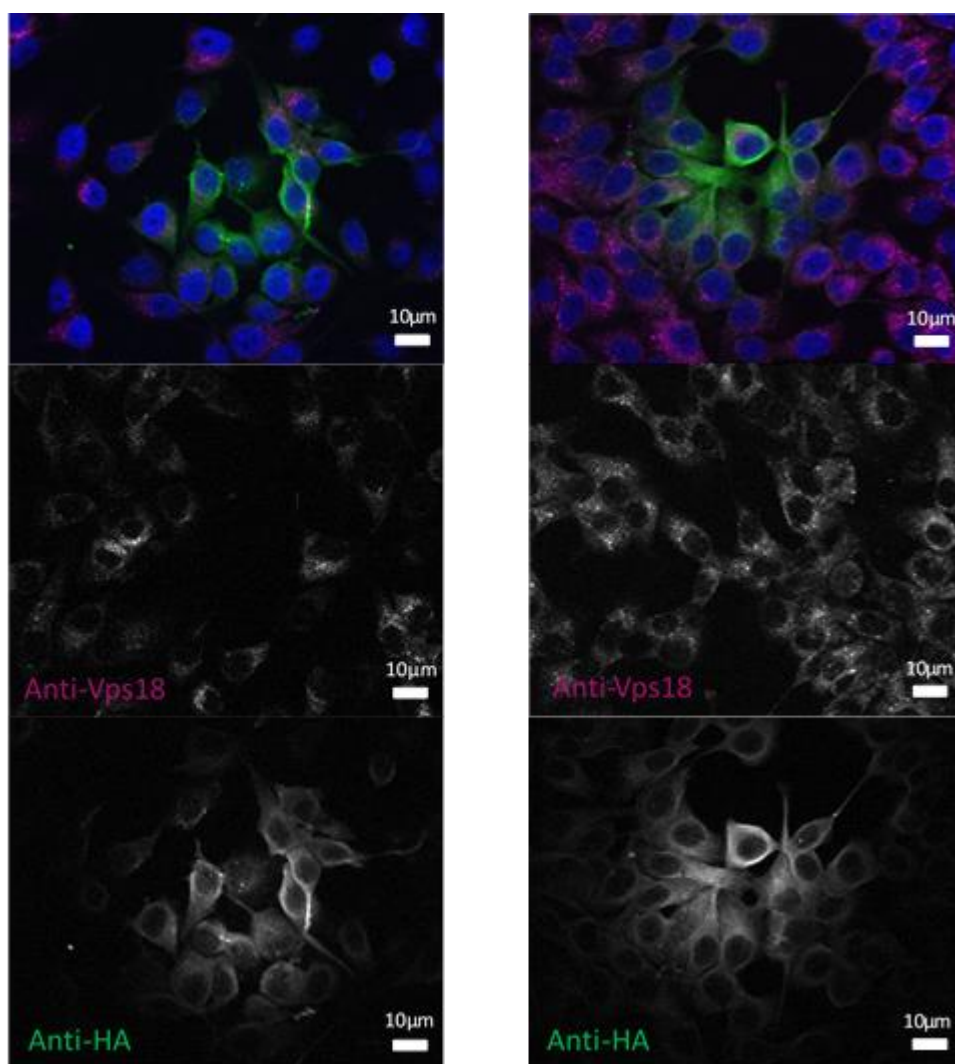
A következőkben az EHD1-Vps45 és az EHD1-Vps18 (11. ábra) kötődését vizsgáltuk, mindegyik esetben 3 féle táptalajon, kontroll reakciókkal végezve az élesztő két hibrid kísérletet. Azt tapasztaltuk, hogy adenin illetve hisztidin hiányos táptalajon sem nőtt fel az élesztő egy konstrukciója sem. Ez alapján elmondható, hogy nincs közvetlen kötődés az EHD1 és a Vps45, Vps18 között.



11. ábra - Az EHD1-Vps45 (bal oldal) és az EHD1-Vps18 (jobb oldal) kötődésének tesztelése 3 különböző táptalajon. SD-WL: triptofán és leucin mentes, SD-WLA: adenin, triptofán és leucin mentes, SD-WLH: hisztidin, triptofán és leucin mentes táptalaj. AD: aktivátor domén, BD: kötő domén

5.3. Immuncitokémia

A feltételezett kölcsönhatás további vizsgálatához kolokalizációs kísérletet végeztünk, mely során EHD1-HA és Vps18-FLAG konstrukciókkal transzfektáltunk HeLa sejteket. A kamrákba kihelyezett a transzfekció után 24 órával fixáltuk, majd immuncitokémiai eljárással, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A vizsgálat során nem tapasztaltunk kolokalizációt az EHD1 és a Vps18 között. (12. ábra)



12. ábra - Az EHD1 és Vps18 között kolokalizáció tesztelése. Zölddel látható az EHD1, magentával pedig a Vps18, kolokalizáció esetén fehér színt várnánk, mely mindkét fehérje együttes elhelyezkedésére utalna.

6. DISZKUSSZIÓ

A pányvázó komplexek változatos biokémiai funkciókat látnak el az endocitózisban, néhány ezek közül: a membránkötés, membránfúzió, endoszómák kapcsolása a citoszkeletonhoz, SNARE-ek összeállításának aktiválása és ellenőrzése (Solinger & Spang, 2013). Ezen felül még valószínűleg további speciális komplexekkel állhatnak kapcsolatban, illetve meg is oszthatják egymással alegységeiket, hogy a sejt számára biztosítsák a megfelelő transzportfolyamatokat.

Munkánk során a CORVET, HOPS és a FERARI pányvázó komplexek alegységei közötti kapcsolatokat vizsgáltuk humán sejteket használva. Immunprecipitáció és western blot alkalmazásával azt tapasztaltuk, hogy a Vps18 esetében anti-FLAG gyöngyökkel végezve az immunprecipitációt detektálható volt a fehérje, míg anti-HA gyöngyökkel húzva nem. Az élesztő két hibrid módszer elvégzése után nem tudtunk direkt kölcsönhatást kimutatni. Az ismert kötőpartnerrel, a rabenosyn-5-tel az EHD1 mindegyik módszerben kölcsönhatást mutatott, tehát a fehérjénk jól működött. Immuncitokémia technikát végezve, arra az eredményre jutottunk, hogy nincs kolokalizáció az EHD1 és Vps18 között.

Összefoglalva, azt feltételezzük az eredmények kiértékelése után, hogy a rabenosyn-5 egy állvány fehérjeként működhet az endoszomális rendszerben. A sejtben különböző helyeken lokalizálódó komplex alegységekkel is mutathat kölcsönhatást, így a rabenosyn-5 közreműködésével alakulhatnak át a komplexek. Például az EHD1, a FERARI komplex részeként közvetett interakciót mutat az ugyanebben a komplexben található Vps45-tel a rabenosyn-5 kötésén keresztül, ugyanakkor a CORVET és HOPS komplexben lévő Vps18-cal is indirekt kapcsolatban állhat. Ennek bizonyítására azonban még további kísérletek szükségesek.

Az EHD1 számos olyan molekula sejtfelszínre történő kihelyeződését irányítja, melyek potenciális gyógyszercélpontok, például az EGFR vagy a GLUT-4. Az új kötő partnerek felfedezése az alap kutatás részeként lehetőséget ad a rendszer alaposabb megismerése és ezáltal a különböző útvonalak pontosabb befolyásolására, a pányvázó faktorok szerepének felderítésére az egyes betegségek kialakulásában.

Szerzői hozzájárulás

- A klónozást én végeztem, a humán sejtek transzfekciójához szükséges plazmidokat én készítettem valamint a sejtek fenntartását, transzfekcióját magam végeztem.
- Az élesztő két-hibrid kísérleteket én készítettem el.
- A western blot és az immunprecipitációs eljárásokat is én csináltam.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Sőth Árminnak a sok segítséget, türelmet és a jó hangulatú, kutatással töltött órákat a munkám során. Köszönöm továbbá az Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék összes munkatársának, főként Juhász Gábor laborvezetőnek, Lőw Péter tanszékvezetőnek és Simon-Vecsei Zsófiának hogy segítették a kutatásom előrehaladását.

Felhasznált irodalom

- Balderhaar, H. J., & Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science*, 126(Pt 6), 1307–1316. <https://doi.org/10.1242/jcs.107805>
- Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). „Pathways and mechanisms of endocytic recycling”. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>
- Guilherme, A., Soriano, N. A., Furcinitti, P. S., & Czech, M. P. (2004). Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(38), 40062–40075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401918200>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Iaconis, D., Crina, C., Brillante, S., Indrieri, A., Morleo, M., & Franco, B. (2020). The HOPS complex subunit VPS39 controls ciliogenesis through autophagy. *Human molecular genetics*, 29(6), 1018–1029. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa029>
- Jachen A. Solinger and Anne Spang (2013): „Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS”, *The FEBS Journal*, 2743-2757.
- Jing Zhang, Naava Naslavsky, and Steve Caplan (2012): „Rabs and EHDs: alternate modes for traffic control”, *Biosci Rep.* 2012 February; 32(1): 17–23. doi:10.1042/BSR20110009.
- Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology*, 25(1), 99–112. <https://doi.org/10.14670/HH-25.99>
- Kaur, G., & Lakkaraju, A. (2018). „Early Endosome Morphology in Health and Disease”. *Advances in experimental medicine and biology*, 1074, 335–343. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_41
- McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F., & Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS letters*, 495(1-2), 21–30. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02359-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02359-6)
- Naslavsky, N., & Caplan, S. (2011). „EHD proteins: key conductors of endocytic transport”. *Trends in cell biology*, 21(2), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.10.003>
- Naslavsky, N., Boehm, M., Backlund, P. S., Jr, & Caplan, S. (2004). Rabenosyn-5 and EHD1 interact and sequentially regulate protein recycling to the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 15(5), 2410–2422. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0733>
- Pálfia Zsolt és Dr. Kristóf Zoltán (2013). „A sejtbológia alapjai” Eötvös Loránd Tudományegyetem, 59-63. o.

Perini, E.D., Schaefer, R., Stöter, M., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2014), „Mammalian CORVET Is Required for Fusion and Conversion of Distinct Early Endosome Subpopulations”. *Traffic*, 15: 1366-1389. <https://doi.org/10.1111/tra.12232>

Posey, A. D., Jr, Swanson, K. E., Alvarez, M. G., Krishnan, S., Earley, J. U., Band, H., Pytel, P., McNally, E. M., & Demonbreun, A. R. (2014). EHD1 mediates vesicle trafficking required for normal muscle growth and transverse tubule development. *Developmental biology*, 387(2), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.004>

Sass Miklós, Laskay Gábor (2013). „Molekuláris sejtbiológia”. Eötvös Loránd Tudományegyetem

Simon-Vecsei Z, Söth Á, Lőrincz P, Rubics A, Tálas A, Kulcsár PI, Juhász G. Identification of New Interactions between Endolysosomal Tethering Factors. *J Mol Biol*. 2021 Jun 25;433(13):166965. doi: 10.1016/j.jmb.2021.166965. Epub 2021 Mar 27. PMID: 33781757.

Solinger JA, Rashid HO, Prescianotto-Baschong C, Spang A. „FERARI is required for Rab11-dependent endocytic recycling”. *Nat Cell Biol*. 2020 Feb;22(2):213-224. doi: 10.1038/s41556-019-0456-5. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988382.

Spang A. (2016). Membrane Tethering Complexes in the Endosomal System. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 35. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00035>

Tom, C.E. et al. (2020). "EHD1 and RUSC2 Control Basal Epidermal Growth Factor Receptor Cell Surface Expression and Recycling" *Mol Cell Biol* Volume 40 Issue 7 e00434-19

van der Beek, J., Jonker, C., van der Welle, R., Liv, N., & Klumperman, J. (2019). CORVET, CHEVI and HOPS - multisubunit tethers of the endo-lysosomal system in health and disease. *Journal of cell science*, 132(10), jcs189134. <https://doi.org/10.1242/jcs.189134>

Whyte JR, Munro S. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci*. 2002 Jul 1;115(Pt 13):2627-37. PMID: 12077354.

Yu IM, Hughson FM. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:137-56. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113327. PMID: 19575650.

A 36. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Horváth Enikő** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **Az EHD1 fehérje új interakciós partnereinek azonosítása az endoszomális rendszerben** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Klónozás	5
Élesztő két-hibrid	5
Humán sejtek fenntartása és transzfektálása	5
Immunoprecipitáció és western blotok	5
Immuncitokémia	5
...	...

Kelt: Budapest, 2022.05.24.

(Kérjük a dőlttel jelölt részeket értelemszerűen adják meg. A táblázat szükség szerint értelemszerűen módosítható).

Kétszerzős pályamunka esetén:

Horváth Enikő

Pályamunkát benyújtó hallgató
(Horváth Enikő)
aláírása

Társszerző (név)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

Sóth Ármin

Témavezető (Sóth Ármin, ELTE-TTK, Anatómia, Sejt-
és Fejlődésbiológiai Tanszék)
aláírása

#Magyarázat:

^{1*} Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható / bővíthető.