

# ÚJ TÁVLATOK AZ S100 FEHÉRJÉK SZERKEZETI BIOLÓGIÁJÁBAN

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Kiss Bence**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Doktori Iskola**

Doktori Iskola vezetője: Prof. Erdei Anna

**Szerkezeti Biokémia Doktori Program**

Programvezető: Prof. Nyitray László



**Témavezető: Dr. Nyitray László**

**Dr. Pál Gábor**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2014

## BEVEZETÉS

Az S100A4 fehérje a kizárólag gerincesekben kifejeződő S100 fehérjecsalád tagja, mely S100 család egy, a kalmodulint is magába foglaló EF-kéz  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő szupercsaládhoz tartozik. Az ide tartozó fehérjék enzimatis aktivitással nem rendelkeznek, hanem partnereikkel való kölcsönhatásuk révén fejtik ki hatásukat azok funkcióit módosítva. Funkciójuk igen változatos, részt vesznek a sejtciklus szabályozásában, a sejtnövekedésben és sejtosztódásban, és fontos szerepet tölthetnek be a sejtek mozgásában is. Szerkezetükre jellemző, hogy általában homodimer formában fordulnak elő. Alegységenként két  $\text{Ca}^{2+}$  iont képesek megkötni, melynek hatására olyan konformáció változáson mennek keresztül, melynek következményeként létrejön a fehérjepartnerrel való kölcsönhatáshoz elengedhetetlen egy-egy hidrofób kötőzseb. Egy S100 dimer jellemzően két, általában amfipatikus  $\alpha$ -hélixet képző fehérjepartnerrel hat kölcsön szimmetrikus módon. Az S100A4, más néven metasztazin az S100 család egyik legkutatottabb tagja, mivel számos kísérletes és klinikai bizonyíték támasztja alá patológiás szerepét olyan betegségekben, mint a tumor metasztázis, reumás ízületi gyulladás, illetve fibrózis. Ezen betegségek mindegyike az ún. epiteliális-mezenhimális átalakulás (EMT) folyamatával hozható összefüggésbe. A folyamat során az alaphártyához rögzült hámsejtek elveszítvén sejt-sejt kapcsolataikat leválnak az alaphártyáról, és invazív kötőszöveti sejtekké alakulnak. Az S100A4 mind sejtben belüli, mint sejtben kívüli kölcsönhatásai révén hozzájárul az EMT-hez. Sejtben kívül a plazminogén-plazmin átalakulást segítve hozzájárul mátrix metalloproteázok aktivációjához, illetve részben ismeretlen receptorokhoz kötődve serkenti azok kifejeződését. Sejtben belül a nem-izom miozin IIA-hoz kötődik (NMIIA), melynek hatására az NMIIA filamentumok funkciója gátlódik, mely a sejtek migrációs képességének növekedésével jár. Ismert kötőpartnere a p53 tumor szupresszor fehérje is, melyhez kötődve befolyásolja sejtek apoptózisát.

Az nem-izom miozinok ATPáz aktivitással rendelkező aktin-kötő fehérjék, melyek bipoláris filamentumokba rendeződve képesek keresztkötni az aktin filamentumokat és azokon erőt generálni. Ezáltal fontos szerepük van a sejtadhézióban és sejtek mozgásában, az utódsejtek szétválásában (citokinézis), a sejtalak fenntartásában és a sejt polarizáció kialakításában. Emberben három izoformájuk ismert. Míg az NMIIA inkább a migráló sejtek vezető élén, addig az NMIIB jellemzően a követő élén, illetve a sejtmag körül lokalizálódik. Enzimatis tulajdonságaikat tekintve az NMIIB jóval nagyobb terhelési aránnyal jellemezhető motorfehérje, ami azt jelenti, hogy a teljes enzimatis ciklusának 4-8-szor annyi idejét tölti aktin-kötött, erőgeneráló állapotban. Ennek köszönhetően az NMIIB

alkalmasabb olyan funkciók ellátására, ahol kevés energiával, hosszan tartó ideig képes aktívt kötni, mint pl. a citokinézis. Az NMIIIC egy viszonylag újonnan felfedezett izoforma, meglehetősen keveset tudunk róla.

Az irodalomból ismert volt, hogy az S100A4 szelektíven az NMIIA-val hat kölcsön, melynek eredményeképp az NMIIA filamentumok szétesnek. Sejttenyészeteken igazolták, hogy ezen kölcsönhatás a sejtek megnövekedett migrációs képességének kialakulásához vezet. Kimutatták, hogy az S100A4 az NMIIA nehézlánc coiled-coil és nem-helikális farok régiójának határán lévő régiójához kötődik. Ez a régió szomszédos a miozin filamentumok kialakulásában létfontosságú *assembly competence domain*-nel (ACD). Bár az S100A4 – NMIIA interakció élettani szerepét meglehetősen jól jellemezték, az S100A4 által indukált NMII filamentum szétesés szerkezeti vonatkozásairól hiányos és sokszor ellentmondó adatok láttak napvilágot. Egyrészt sem a kölcsönhatás erősségét, sem sztöchiometriáját sem sikerült egybehangzóan megállapítani, így a funkcióját tekintve jól ismert interakció szerkezeti biokémiai részletei rejtve maradtak.

## CÉLKITŰZÉSEK ÉS MÓDSZEREK

A fentiek alapján munkám megkezdésekor az alapvető célom az volt, hogy a szerkezeti biokémia módszereivel felderítsem az NMIIA filamentumok S100A4-függő disszociációjának mechanizmusát. Ehhez a következő részfeladatokat kellett elvégeznem:

1. az NMIIA S100A4 kötőhelyének pontos meghatározása,
2. az interakció jellemzése: affinitás, kinetika, sztöchiometria ITC, illetve felszíni plazmon rezonancia (SPR) technikákkal,
3. az első S100A4 – célfehérje komplex 3D szerkezetének meghatározása röntgen krisztallográfiával,
4. dimer NMIIA S100A4-gyel való kölcsönhatásának jellemzése: affinitás, kinetika, másodlagos szerkezetbeli változások meghatározása ITC, *stopped-flow* fluoreszcens spektroszkópia és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia segítségével,
5. az S100A4 NMII filamentumokra gyakorolt hatásának jellemzése turbidometriával,
6. a rendezetlen S100A4 C-terminus NMIIA kötésben betöltött szerepének újraértékelése ITC, fluoreszcencia polarizációs mérések, turbidometria használatával.

Másfelől választ kerestem arra a kérdésre, hogy milyen szerkezeti okai vannak az S100A4 – NMII kölcsönhatás izoforma specifikitásának, azaz a nagyfokú homológiát mutató NMII izoformák szekvenciájában melyek azok a pozíciók, melyek felelősek az NMIIIB izoforma gyengébb kötődéséért. Ennek érdekében a következő kísérleteket céloztam elvégezni:

1. NMII kimérák létrehozásával rámutatni azon régió(k)ra, valamint paralóg szkenneléssel kombinált fág bemutatás segítségével rámutatni azon pozíció(k)ra az NMII S100A4 kötőhelyben, amelyek meghatározzák az izoforma specifikitást,
2. a fág bemutatás eredményeit monomer és dimer NMII fragmentumokon tesztelni SPR, *stopped-flow* fluoreszcens spektroszkópia, valamint turbidometria segítségével.

## EREDMÉNYEK

1. Különböző hosszúságú, egymással részben átfedő NMIIA nehézlánc fragmentumok S100A4-gyel való kölcsönhatását jellemeztem ITC-vel. A mérésekből kiderült, hogy az S100A4 kötőhely szokatlanul hosszú (45 aminosav), példátlanul nagy affinitású (< nM) és egy NMIIA lánc egy S100A4 dimerrel hat kölcsön.
2. A 45 aminosavas NMIIA fragmentum S100A4-gyel alkotott komplexét megkristályosítottuk, melynek atomi felbontású szerkezete egy merőben új interakciós módról tett tanúbizonyságot az S100 fehérjecsaládban.
3. Az NMIIA coiled-coil stabilitása csökken az S100A4 kötődésének hatására, mely érinti az ACD-t is.
4. Igazoltam, hogy az NMIIA filamentumok teljes széteséséhez 1 S100A4 dimer / 1 miozin nehézlánc szükséges.
5. Bizonyítottam, hogy az S100A4 rendezetlen C-terminálisa nem járul hozzá az NMIIA-val való kölcsönhatáshoz.
6. Kimutattuk, hogy a C-terminális régió képes kötődni az üres EF-kéz motívumokhoz, mely kölcsönhatás modulálja az S100A4 kalcium ionnal történő interakcióját.
7. Felfedeztem, hogy az NMIIIC az NMIIA-hoz hasonló 0,1 nM-os affinitással hat kölcsön az S100A4-gyel, míg az NMIIIB esetében 300-szor gyengébb a kölcsönhatás.
8. A helikális kötőrégió egyetlen aminosav cseréje kitüntetett szereppel bír a szelektivitásban. Itt az NMIIIB olyan oldalláncot hordoz, amely az A és C izoformához képest 60-szoros affinitáscsökkenést okoz.
9. A nem-helikális fark régiók kölcsönös cseréje rámutatott, hogy az S100A4 coiled-coil képző NMII fragmentumokkal történő kölcsönhatása során az NMIIA rendezetlen kötőrégióját hordozó NMII variánsok asszociációs rátája jelentősen nagyobb, mint az NMIIIB fark régiót hordozóké.
10. A hődenaturációs kísérletek rávilágítottak, hogy az NMIIIB coiled-coil jóval nagyobb stabilitással bír, mint az NMIIA, mely hozzájárulhat az S100A4 NMIIIB-hez történő mérsékeltebb asszociációs rátájához.
11. Az eredmények alapján megalkottam az első szerkezeti modellt, mely magyarázza az S100A4-indukált NMII filamentum szétesést.

# KÖVETKEZTETÉSEK

## Az S100A4 – NMIIA komplex kristályszerkezete

Doktori munkám kezdeti szakaszában az NMIIA S100A4-kötőhelyének térképezését kellett elvégezni, mivel az irodalmi adatok igen ellentmondásosak voltak a kölcsönhatás erősségét és sztöchiometriáját illetően. Az ITC méréseim rámutattak, hogy az S100 családban szokatlanul nagy affinitású és egyedi módon kötő, viszonylag hosszú, 45 aminosavas régióról beszélhetünk. Az S100A4 egy mutáns variánsát (C3S, F45W, C81S, C86S) sikerült megkristályosítanom a monomer NMIIA fragmentummal, mely bizonyította, hogy egy merőben új interakciós módra sikerült fényt deríteni. Egyetlen, zömében  $\alpha$ -helikális szerkezetű NMIIA peptid körbetekeredik a dimeren, miközben kölcsön hat az S100A4 dimer mindkét kanonikus kötőzsebével. Rendkívül érdekes, ahogy az S100 fehérjecsaládban szekvenciálisan legváltozatosabb régió, mely részben a kötőhelyet képezi hogyan adaptálódik az egy-egy S100A4 alegységben az NMIIA peptid eltérő kémiai karakterű régióihoz. A kanonikus kötőzsebek flexibilitásán túl a kristályszerkezet egy új interakciós felszínre hívta föl a figyelmet. Ez a széles árok a kanonikus kötőzsebek között helyezkedik el összekötve azokat. Az ismert S100 szerkezetek alapján elmondható, hogy ez a felszín más S100 fehérjékben is megtalálható, azaz potenciálisan egyéb kölcsönhatások esetében is kötőrégióként funkcionálhat.

Eredményeink publikálása után napvilágot látott egy olyan kristályszerkezet, melyben az S100A10 fehérje ezen a régióját használja egy rendezetlen kötőpartner lánc, bár ebben az esetben a kanonikus kötőzsebekkel szimmetrikus módon hat kölcsön két  $\alpha$ -helikális fehérje ligandum a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően. Fontos megjegyezni, hogy doktori munkám nyomán kiterjedt vizsgálatok indultak meg laboratóriumunkban annak kiderítésére, hogy vajon mennyire általános az esetemben tapasztalt aszimmetrikus interakciós mód az S100 családban, illetve az S100A4 esetében. Ennek eredményeképp már több olyan direkt szerkezeti információ is a rendelkezésünkre áll, mely alátámasztja a feltevést, miszerint az aszimmetrikus kötődési mód általánosabb az S100 családban, mint ahogy azt eddig gondoltuk.

## Az S100A4 negatívan diszkriminálja az NMIIIB-t

Az eddigi vélekedések szerint az S100A4 NMII izoforma szelektivitását a nem-helikális farok régió kell, hogy okozza, hiszen ez a régió mutatja a legnagyobb eltéréseket az

izoformák között. Ám eredményeim szerint az NMIIIC ugyanolyan erősséggel hat kölcsön az S100A4-gyel, mint az NMIIA, miközben C-terminálisa az NMIIIB izoformájéhez hasonlít inkább. Ehhez ha hozzávesszük, hogy az S100A4 kötőhely rendezetlen C-terminálisának deléciója jóval kisebb affinitás csökkenést okoz, mint a hasonló méretű szekvencia N-terminálisról való eltávolítása, arra jutunk, hogy szelektivitást a helikális kötőrégióban lévő különbségek kell, hogy determinálják. Fág bemutatással kombinatorikus paralóg szkennelést végeztem, mely rámutatott, hogy egyetlen pozíció cseréje a gyengén kötő NMIIIB és erősen kötő másik két izoforma között 60-szoros affinitásbeli változást okoz. Emellett megvizsgáltam a nem-helikális kötőrégió szerepét is, mely rámutatott, hogy az NMIIA C-terminálisa a legkedvezőbb S100A4-kötés szempontjából, és ezen régió milyensége jelentősen befolyásolja az S100A4 dimer NMII-höz történő kötődésének asszociációs sebességét. Másfelől kiderült, hogy meglepő módon az NMIIIB jóval nagyobb stabilitású, mint az NMIIA, mely magyarázhatja, hogy miért marad el az NMIIA nem-helikális régiójával rendelkező NMIIIB coiled-coil kiméra (NMIIIBA) asszociációs sebessége az NMIIAB esetén mért értéktől.

### **Az S100A4-indukált NMIIA filamentum szétesés modellje**

Egyfelől kimutattam, hogy az S100A4 mind oldatban lévő, mind filamentumot képző dimer NMII fragmentumokkal is a kristályszerkezetben látottaknak megfelelő sztöchiometriával hat kölcsön. Másfelől bizonyítottam, hogy az S100A4 NMIIA coiled-coilhoz történő kötődése a kötőhelytől N-terminális irányban destabilizálja a coiled-coilt, mely legalább részben az ACD letekeredéséhez vezet. Gyorskinetikai méréseim pedig rámutattak, hogy a nem-helikális farok régió befolyásolja az S100A4 NMII-höz történő asszociációjának sebességét. Ezek alapján a következő modellt állítottuk föl:

1. Az S100A4 kötődik az NMII nem-helikális farok régiójához,
2. "szétnyitja" a C-terminális coiled-coilt magára tekervén abból kb. 30 aminosav hosszú régiót,
3. ezzel együtt az interakciótól N-terminális irányban további kb. két heptád hosszú szakaszon széttekeredik a coiled-coil, mely az ACD destabilizációjához vezet,
4. így az S100A4 a kötődése révén fellépő direkt sztérikus hatással együtt az NMII filamentum szétesését idézi elő, illetve gátolja annak összeállását.

## A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

**Kiss B**, Duelli A, Radnai L, Kékesi KA, Katona G, Nyitray L. *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.

Duelli A, **Kiss B**, Lundholm I, Bodor A, Petoukhov MV, Svergun DI, Nyitray L, Katona G. *The C-Terminal Random Coil Region Tunes the Ca<sup>2+</sup>-Binding Affinity of S100A4 through Conformational Activation*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97654.