

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A lizil oxidáz enzim és a placentális laktogén hormon kölcsönhatása valamint szerepük az emlő epiteliális sejtek osztódásában és migrációjában.

Polgár Noémi

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetikai Tanszék
és
University of Hawaii John A. Burns School of Medicine
Cardiovascular Research Center

Témavezetők:

Dr. Csiszár Katalin egyetemi tanár
University of Hawaii John A. Burns School of Medicine
Cardiovascular Research Center

Dr. Mink Mátyás egyetemi docens
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetikai Tanszék

Szeged

2008

1. Bevezető

Az emlőrák a nők körében leggyakrabban előforduló rákos megbetegedés, évente 1×10^6 nőt diagnosztizálnak világszerte mellrákkal. Az emlődaganatok kialakulásának kockázata a nőkben az életkortól, az emlőmirigy tömegétől és endo- illetve exogén hormonhatásoktól függően eltérő lehet. Ugyanakkor a tumorigenezist kiváltó, genetikai változásokból eredő molekuláris mechanizmusok, kölcsönhatások és azok regulációja, illetve a tumorsejtek migrációjának, inváziójának valamint a karcinómák áttétképződésének pontos molekuláris folyamatai még nem tisztázottak. Mivel az áttétek keletkezése a rák gyógykezelésében komoly kihívást jelent, a metasztatikus képességet jelző molekuláris markerek azonosítása és az áttétes tumorképződés folyamatának megértése kiemelkedő fontosságú. A közelmúltban egy normál, non-invazív emlő tumor és invazív emlőrák sejtvonalakon végzett, átfogó transzkriptóma-elemzés során a lizil oxidázt (LOX) eltérő expressziója alapján potenciális marker génként azonosították. Ezen felül a LOX emelkedett expresszióját és enzimaktivitását figyelték meg mellrák szövetekben és invazív/metasztatikus emlőrák sejtvonalakban. A lizil oxidáz fő ismert funkciója az extracelluláris mátrix komponenseinek keresztkötése, így azon szabályozó és kölcsönható faktorok, melyek hozzájárulnak az enzim újonnan leírt, mellrákban betöltött funkciójához, még felderítésre várnak. Korábbi élesztő két-hibrid szűréseink a lizil oxidáz és a terhesség-specifikus hormon, a placentális laktogén (PL) interakcióját mutatták ki. A PL a szomatotropin-prolaktin hormoncsalád tagja, mely normál körülmények között a placenta szinciciotrofoblasztjaiban termelődik, és a laktogenezisben valamint a magzat növekedésében és fejlődésében játszik szerepet. A növekedési hormonhoz és a prolaktinhoz hasonlóan a placentális laktogén expresszióját is leírták már emlő eredetű tumorokban, ugyanakkor a tumorigenezisben betöltött szerepe, ahogy a LOX-PL kölcsönhatás szerepe is ezekben a folyamatokban még tisztázásra vár.

2. Célkitűzések

E tanulmány célja volt az újonnan kimutatott LOX-PL kölcsönhatás igazozása, mely feltehetően a LOX enzim daganatképződésben betöltött funkciójával van szoros összefüggésben, továbbá a kölcsönhatás karakterizálása, biológiai jelentőségének felderítése. A célkitűzések a következők voltak:

1. célkitűzés

Az élesztő két-hibrid kísérletekben kimutatott LOX-PL interakció igazolása élesztő direkt kölcsönhatás vizsgálatokkal.

Az élesztő két-hibrid PL könyvtárfehérje és a LOX „csali” fehérjék kölcsönhatásának tesztelése élesztőkben a könyvtár és „csali” plazmidok kombinációinak kotranszformálásával és a riporter-gén aktivitás elemzésével.

2. célkitűzés

Az élesztő két-hibrid szűrésben több klón által reprezentált placentális laktogén és LOX kölcsönhatásának további igazolása és jellemzése.

- a) Expressziós konstruktumok létrehozása a LOX és annak deléciós fragmentumainak bakteriális termeltetése céljából.
- b) A rekombináns LOX fehérjék termeltetése és tisztítása a további *in vitro* vizsgálatokhoz elegendő mennyiségben.
- c) *In vitro* kölcsönhatás-vizsgálatok: pull-down és Far Western módszerrel.
- d) A fehérjekölcsönhatás disszociációs állandójának (K_d) meghatározása módosított ELISA módszerrel, valamint a LOX affinitásának tesztelése a hormoncsalád másik két tagjával, a növekedési hormonnal (GH) és a prolaktinnal (PRL) szemben.

3. célkitűzés

A LOX-PL kölcsönhatás *in vivo* vizsgálata.

- a) Az irodalmi adatok alapján valószínű LOX és PL expresszió vizsgálata emlőrák eredetű szövetmetszeteken immunfluoreszcens festési eljárással, koexpressziójuk tesztelése.
- b) Egy megfelelő *in vivo* modell kiválasztása, melyben a natív LOX-PL komplex vizsgálható koimmunoprecipitációval.

4. célkitűzés

Az azonosított LOX-PL interakció az enzim katalitikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata.

Enzimaktivitás-vizsgálatok végrehajtása a fehérje-kölcsönhatás természetének felderítése céljából, illetve az esetleges enzim-szubsztrát vagy enzim-regulátor viszony meghatározása.

5. célkitűzés

A fehérje-kölcsönhatás biológiai szerepének vizsgálata.

- a) A további fenotipikus elemzésekhez megfelelő, LOX-ot és/vagy PL-t stabilan túltermelő sejtvonalak létrehozása.
- b) A sejtek fenotipikus jellemzése a túltermelő sejtvonalak proliferációs és migrációs tulajdonságainak vizsgálata révén.

3. Anyagok és módszerek

E tanulmány során a korábbi élesztő két-hibrid vizsgálataink által kimutatott lizil oxidáz-placentális laktogén fehérje-kölcsönhatást igazoltuk és jellemeztük. A biokémiai analízishez rekombináns GST-LOX deléciós konstruktumokat klónoztunk, majd a fúziós fehérjéket *Escherichia coli*-ban termeltettük és tisztítottuk. Az élesztő direkt kölcsönhatás-vizsgálatok, a szilárd fázisú kötési vizsgálatok és a pull-down kísérletek igazolták a LOX-PL kölcsönhatást *in vitro*, illetve a kötési affinitás is meghatározásra került. Enzim aktivitási mérésekkel teszteltük az interakció hatását a LOX katalitikus működésére. A fehérjék expresszióját immunfluoreszcenciával határoztuk meg egy konfokális mikroszkóp segítségével emlőrák eredetű szövetmetszetekben. Western blot analízissel teszteltük a fehérjék expresszióját emlőrák sejtvonalakban, az *in vivo* kölcsönhatást koimmunoprecipitációval vizsgáltuk. Immortalizált, normál emlő epithelium eredetű sejtvonalakat lentivirális vektorokkal transzdukáltunk, ezzel a LOX és/vagy a PL túltermelésére készítetve őket. Ezt követően a LOX és a PL túltermelésének egyedi és együttes, a sejtek viselkedésére gyakorolt hatását analizáltuk ezen sejtvonalakon. A proliferatív eltéréseket proliferációs tesztekkel, a motilitásbeli eltéréseket először az aktin citoszkeleton lehetséges átrendeződését feltáró falloidin festéssel, majd migrációs esszékkel tanulmányoztuk.

4. Eredmények

4.1. Rekombináns, GST-fuzionált LOX deléciós fragmenteket sikeresen klónoztunk, és expresszáltattunk *E. coli* baktériumban. A kezdeti, részben sikeres törekvéseink után, melyekben e proteineket szolubilis formában kíséreltük meg tisztítani, az inklúziós testekből sikerült a további *in vitro* biokémiai analízisekhez elegendő mennyiségű fehérjét kitisztítanunk.

4.2. Élesztő direkt kölcsönhatási, pull-down és Far-Western vizsgálataink során igazoltuk, hogy a LOX enzim valóban köt a PL hormonhoz. Ezen felül felfedeztük, hogy a lizil oxidáz mellett az enzimesalád egy további tagja, a lizil oxidáz-szerű 2 (LOXL2) fehérje is kötődik a placentális laktogénhez.

4.3. Módosított ELISA esszék során képesek voltunk leszűkíteni a LOX azon régióját (aa169-348), ami a PL-nel való kölcsönhatásban vesz részt, valószínűleg a LOX C-terminális CRL doménjével összhangban.

4.4. Továbbá bemutattuk, hogy a LOX enzim nemcsak a PL-t köti, hanem affinitást mutat a hormonsalád két másik, homológ tagja, a növekedési hormon (GH) és a prolaktin (PRL) felé is, habár az enzim affinitása e hormonokhoz két nagyságrenddel alacsonyabb, mint a természetes szubsztrátjaihoz való affinitása.

4.5. Enzimaktivitási méréseink során megállapítottuk, hogy a PL nem szubsztrátja az enzimnek, mivel az nem mutatott aktivitást a hormon mint szubsztrát jelenlétében.

4.6. Ezen felül, mivel a LOX megőrzi katalitikus aktivitását kadaverin szubsztráttal szemben PL jelenlétében, azt állapítottuk meg, hogy a hormon valószínűleg nem rendelkezik a LOX enzimaktivitását gátló hatással.

4.7. A LOX és PL koexpressziót kettős immunfestéssel vizsgáltuk mellrák szövetmetszeten, és a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően mindkét fehérje expresszióját igazoltuk emlő karcinómákban.

4.8. Ezt követően a fehérjék koexpresszióját emlőrák eredetű sejtvonalakban tanulmányoztuk Western blot módszerrel, és kimutattuk, hogy az erősen invazív és metasztatikus Hs578T és

MDA-MB231 sejtvonalak nemcsak a LOX-ot, hanem a PL-t is megemelkedett mértékben termelik.

4.9. A PL-LOX koexpresszáló Hs578T emlőrák sejtekkel végzett koimmunoprecipitációs próbák folyamán igazoltuk, hogy a fehérjék kölcsönhatása *in vivo* is létrejöhet.

4.10. A LOX és PL túltermelésének egyedi és együttes hatását az emlő epiteliális sejtekben vizsgálándó, immortalizált normál emlő epitehliális MCF-10A sejteket transzdukáltunk lentivirális vektorokkal, hogy stabilan expresszálják a két fehérjét, majd azok emelt szintű expresszióját Western blottal igazoltuk.

4.11. Mivel a placentális laktogén szerepet játszik a sejtosztódás indukciójában, a transzdukált sejtvonalakon a sejtosztódást teszteltük. Azt találtuk, hogy a PL túltermelése az MCF-10A sejtekben szignifikánsan emelkedett proliferációs rátát eredményezett, míg LOX-zal való koexpressziója tovább növelte a sejtosztódások arányát. A LOX enzim túltermelése önmagában nem vezetett ilyen változásokhoz.

4.12. A másik általunk vizsgált sejtes folyamat a migráció volt, mivel az irodalomban közöltek alapján a lizil oxidáz túltermelése egy nagyobb mértékben migráló fenotípust indukál az amúgy kevésbé invazív, nem metasztatikus emlőtumor sejtvonalakban. Először az aktin citoszkeletont falloidinnel festettük, hogy a motilisebb fenotípusra utaló lehetséges citoszkeleton-átrendeződéseket felderítsük. Érdekes módon, minden transzdukált sejtvonalban az aktinszerkezet átrendeződését, és számos, hosszú filopódium megjelenését tapasztaltuk. Ezért úgy döntöttünk, hogy a transzdukált sejtvonalak vándorlási képességét migrációs eszközben teszteljük. Eredményeink alapján a LOX túltermelése önmagában nem elegendő egy jobban migráló fenotípus indukálásához a normál emlő epiteliális sejtekben, ellentétben a kevésbé invazív, nem metasztatikus emlőtumor sejtvonalakkal. Hasonlóképp, a PL túltermelése sem okoz változást a sejtjárási mintázatokban. Ugyanakkor azon sejtvonalak, melyek egyszerre termelték a LOX és PL fehérjéket emelkedett szinten, szignifikánsan magasabb migrációs arányokat mutattak a többi sejténél.

Következtetések

Munkánk során az extracelluláris mátrix enzim lizil oxidáz és a hormon placentális laktogén kölcsönhatását igazoltuk és jellemeztük *in vitro* és *in vivo* módszerekkel. Azt találtuk, hogy a LOX mellett, az enzimsalád egy további tagja, a LOXL2 enzim is képes a PL hormont kötni. Érdekes módon az enzimsalád e két tagja összefüggésbe hozható a daganatképződés folyamataival, ám pontos szerepük még felderítésre vár. Eredményeink alapján a LOX nemcsak a PL-t köti, hanem affinitást mutat a hormoncsalád másik két tagjával, a növekedési hormonnal és a prolaktinnal szemben is, melyek onkogén szerepe ismert.

In vitro amin oxidáz esszéink demonstrálták, hogy a PL nem szubsztrátja és nem is inhibitora a lizil oxidáznak. A kölcsönhatásuk pontos mechanizmusa és módja még tisztázásra vár.

Szövetmetszeteken végzett immunfluoreszcens festéseink által LOX és PL expressziót detektáltunk emlőtumor sejtekben és környezetükben. Ezt követően a fehérjék expresszióját vizsgáltuk emlőtumor sejtvonalakban, és a PL emelkedett szintű expresszióját találtuk az erősen invazív és metasztatikus MDA-MB231 és Hs578T sejtekben, melyekben a LOX emelkedett szintű termelését is tapasztaltuk.

Továbbá a kevésbé invazív és nem metasztatikus MCF-7 sejtekben magas, míg a T47D sejtekben alacsonyabb szintű PL expresszió volt detektálható. Mivel az erősen invazív és metasztatikus sejtvonalakban mindkét fehérje termelődik, úgy döntöttünk, megvizsgáljuk azok a sejtek viselkedésére gyakorolt egyedi és együttes túltermelésének hatását normál emlő epiteliális sejtekben is.

A LOX szerepet játszik a sejtvándorlás folyamataiban, míg a PL egyik funkciója a sejtosztódás indukciója; ezért tehát ezen sejtes folyamatok vizsgálatát is elvégeztük. A PL-t és LOX-ot stabilan túltermelő normál emlő epiteliális MCF-10A sejtek emelkedett osztódási rátát mutattak a parentális és a csak PL-t termelő MCF-10A sejtvonalakhoz képest. A LOX túltermelés önmagában nem volt semmilyen detektálható hatással a sejtosztódási rátákra. A LOX koexpressziója a PL-nel tehát úgy tűnik, felerősíti a PL által indukált sejtosztódást.

A koexpresszáló sejtek ezen felül szignifikánsan magasabb migrációs szinteket is mutattak, mint a parentális vagy csak az egyik fehérjét termelő MCF-10A sejtek.

Eredményeink tehát demonstrálták, hogy a lizil oxidáz a tumorsejtek migrációját a már általunk korábban leírt, H_2O_2 -indukált FAK/Src jelátviteli útvonal serkentése mellett, a placentális laktogénnal való kölcsönhatása révén, más független jelátviteli útvonalakon keresztül is elősegítheti.

Kapcsolódó publikációk:

- Ben Fogelgren, Noémi Polgár, Kornélia Molnárné Szauter, Zsuzsanna Újfaludi, Rozália Laczkó, Keith S. K. Fong, and Katalin Csiszar **Cellular Fibronectin Binds to Lysyl Oxidase with High Affinity and Is Critical for Its Proteolytic Activation**; *J. Biol. Chem.*, Jul 2005; 280: 24690 – 24697
- Noemi Polgar, Ben Fogelgren, J. Michael Shipley, and Katalin Csiszar **Lysyl Oxidase Interacts with Hormone Placental Lactogen and Synergistically Promotes Breast Epithelial Cell Proliferation and Migration**; *J. Biol. Chem.*, Feb 2007; 282: 3262 - 32

Poszterek

- 2005 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research
Ben Fogelgren, Noemi Polgar, Sheri F.T. Fong, Kornelia Molnarne Szauter, Zsuzsanna Ujfaludi, Keith S.K. Fong, Katalin Csiszar **Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation**, *Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res.* 2005;46:[3765]
- 2005 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research
Sheri F. T. Fong, Ben Fogelgren, Kornelia Molnarne Szauter, Christopher Moon, Peter Hollosi, Noemi Polgar, Valerie Weaver, Dawn Kirschmann, Katalin Csiszar **Lysyl oxidase (LOX) is expressed in the microenvironment of breast tumor cells and promotes epithelial plasticity, invasive properties and metastasis** *Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res.* 2005;46:[3785]
- 2006 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research
Noemi Polgar, Ben Fogelgren, Katalin Csiszar **The interaction of lysyl oxidase with the placental lactogen hormone and its potential role in breast cancer**, *Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res.* 2006; 47:[3427]
- N. Polgar, B. Fogelgren, J.M. Shipley and K. Csiszar
A lysyl oxidase interaction promotes epithelial cell migration
Matrix Biology, Volume 25, Supplement 1, November 2006, Page S92

Előadások:

- 2003 A Magyar Kardiológus Társaság Éves Kongresszusa -előadások
 - Blazsó P, Sepp R, Polgár N, Rácz P, Pálincás A, Mogensen J, McKenna WJ, Csanády M, Forster T. **Mutation analysis of the troponin I gene in hypertrophic cardiomyopathy** *Cardiologica Hungarica* 2003; 33: A73.
 - Polgár N, Sepp R, Rácz P, Blazsó P, Dongó Á, Jebelovszki É, Pálincás A, Csanády M, Forster T. **Mutation analysis of the beta myosin heavy chain gene in dilated cardiomyopathy.** *Cardiologica Hungarica* 2003; 33: A74
 - Rácz P, Sepp R, Blazsó P, Polgár N, Pálincás A, Mogensen J, McKenna WJ, Csanády M, Forster T. **Mutation analysis of the troponin T gene in Hungarian hypertrophic cardiomyopathy patients.** *Cardiologica Hungarica* 2003; 33: A72.