

β -katenin ve Axin2 proteinleri etkileşimlerinin “Proksimiti Ligasyon Assay (Yakınsal Bağlanma Tespiti)” ile görüntülenmesi

Visualization of β -catenin and Axin2 protein interaction using Proximity Ligation Assay

¹Yücel Erbilgin, ¹Özden Hatırnaz Ng, ¹Müge Sayitoğlu,
²Ola Söderberg, ¹Uğur Özbek*,

¹.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi.

².Rudbeck Laboratory, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University

ÖZET

Amaç: Sinyal yolları ve proteinlerin fonksiyonel olarak derinlemesine çalışılmasının gerekliliği nedeni ile, proteomiks çalışmalarında protein-protein etkileşimlerinin analizi her geçen gün daha da önemli hale gelmektedir. Proksimiti ligasyon assay (PLA), hücre ve doku kesitlerinde hücre içi proteinlerin ve protein interaksyonlarının keşfedilmesi amacı ile kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu çalışmada, PLA yöntemini kullanarak, WNT sinyal ileti yolağı proteinlerinden aktive β -katenin ve Axin2 proteinlerinin etkileşimlerini bir T-hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) hücre hattı olan Jurkat hücrelerinde göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Jurkat hücreleri RPMI' lı besi yerinde yetiştirilip lamlara fikse edilir. Geçirgen hale getirilen hücreler blokaj aşamasından ardından birincil antikorlar ve PLA problemleri ile muamele edilirler. Hibridizasyon ve ligasyonun ardından sirküle oligonükleotidler, sirküle dönen amplifikasyon (RCA) için substrat oluştururlar. RCA ürünleri Texas Red işaretli problemlerin hibridizasyonu ile işaretlenir ve in situ PLA sinyalleri floresan mikroskopunda görüntülenir.

Bulgular: Öncelikle hücre içi β -katenin and Axin2 protein ekspresyonları belirlendi. Ardından aktive β -katenin-Axin2 protein interaksyon varlığı hem nükleus hem de sitoplazmada gösterildi.

Sonuç: Burada sunulan sonuçlar, in situ PLA tekniğinin, WNT yolağı üyelerinin birbirleri ile olan etkileşimlerinin hücre boyutunda tespit edilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda, aktive β -katenin-Axin2 protein etkileşimini T-ALL hücre soyunda (Jurkat) gösterdik. Bu WNT sinyal yolağının T-ALL de bozulmuş regülasyonuna işaret ettiğini göz önünde bulundurursak WNT yolağı elemanları yeni tedavi protokolleri için birer hedef molekül halini alabilirler.

ABSTRACT

Objective: Analyses of protein-protein interactions (PPIs) are attracting more and more attention in the field of proteomics, caused by the necessity of in-depth functional study of proteins and signaling networks. Proximity ligation assay (PLA) is a novel method that has the advantage that it can be utilized for detection of endogenous proteins and PPIs in cultured cells and tissue sections. The aim of the study was to determine active β -catenin and Axin2 interactions, which are members of the WNT pathway, in the T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell line- Jurkat using in situ PLA.

Materials and Methods: Jurkat cells were cultured in RPMI media and fixed on glass slides. After permeabilization, the slides were blocked and incubated with primary antibodies and PLA probes. Hybridization and ligation of the circularization oligonucleotides were then performed to generate a substrate for the subsequent rolling circle amplification (RCA). The RCA products were visualized by hybridization of Texas Red labelled detection probes and the resulting in situ PLA signals were then detected by fluorescence microscopy.

Results: Both β -catenin and Axin2 proteins were found to be expressed in Jurkat cells and interactions between these proteins were detected both in nucleus and cytoplasm.

Conclusion: The resulted presented herein show that in situ PLA could be used to visualize interactions between endogenously expressed WNT pathway members in single cells. We detected active β -catenin-Axin2 interaction in the T-ALL cell line Jurkat, a sign of deregulated WNT signaling which could be a potential target for future therapeutics.

GİRİŞ

Sinyal ileti yolları üzerine yapılan çalışmalar, proliferasyon, göç ve apoptoz gibi hücrel süreçlerin anlaşılmasını kolaylaştırmış, kanser gibi multifaktöryel hastalıkların patogenezi ve tedavisinde kullanılacak hedef moleküllerin keşfine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (1). Sinyal proteinlerinin aktivitesi çoğunlukla hızlı fosforilasyon, ubiquitinasyon, asetilasyon ve glikozilasyonu içine alan post-translasyonel modifikasyonlarca kontrol edilmektedir. Hücre içi sinyal süreçlerinin araştırılması ve daha iyi anlaşılması için özgün post translasyonel modifikasyonların dinamiğini görüntüleyecek yeni yöntemlere ihtiyaç vardır (2).

Rutininde sıkça kullanılan immünohistokimyasal teknikler, proteinlerin dağılımının mikroskop ile analizine imkan vermesine rağmen, etkileşimde bulunan proteinlerin oluşturdukları komplekslerin tespitine imkan tanımamaktadır. Antikora dayalı in situ analizlerin avantajı, kuvvetli sinyal eldesi ve özgün olmayan arka plan floresan ışımalarından kurtulmaktır (3). Sinyaller, floresan işaretleyiciler kullanılarak proteinlerin tespiti ve işaretleyicilere bağlı olarak bulunan peroksidaz vb. enzimlerin reaksiyonu ile gerçekleşen renk reaksiyonu sonucu elde edilir. In situ Proksimiti Ligasyon Assay (PLA) teknolojisi yardımı ile hedef proteinler ve bu proteinler arasındaki ilişkinin hassas bir şekilde görüntülenebilmesi mümkün olmuştur (4). Bu teknikle kullanılan prob, kısa tek zincirli DNA ile konjuge edilmiş antijenleri bağlayabilen bölgeler içermektedir. Bunun gibi iki yakın probun ("proksimiti gösteren") aynı hedef moleküle bağlanması ve sonrasında bağlayıcı ("connector") oligonükleotidin eklenmesi ile konjuge DNA ipliklerinin ucu hibridize edilir. Bağlanma ("ligasyon") sonucu bir DNA zinciri ortaya çıkar ve bu DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile çoğaltılabilir (5).

WNT sinyal ileti yolu, evrim boyunca korunmuş bir yolak olup proliferasyon, polarite, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre göçü gibi birçok erken dönem gelişim basamaklarında rol oynamaktadır. Bozulmuş WNT yolağı regülasyonu birçok kanserde görülmektedir (6). WNT yolağı, β -katenin bağımlı (kanonik) ve β -katenin bağımsız (nonkanonik) olmak üzere iki ayrı sinyal ileti ile çalışmaktadır. Kanonik yolak proteinleri iyi çalışılmış olup 50 den fazla protein üyesi tanımlanmıştır (7). Bu proteinlerin merkezinde β -katenin bulunmaktadır. Uyarıcı yokluğunda sitoplazmik β -katenin, APC ve AXIN proteinleri ile etkileşir ve GSK3 β tarafından fosforillenir. Fosforillenen β -katenin ubiquitinasyona uğrayarak proteozomda yıkılır. WNT ligandı Frizzled ailesi reseptörlerine bağlandığında ise APC/AXIN/GSK3 β kompleksi inhibe edilir ve

fosforillenmemiş (aktif) β -katenin nükleusa göç eder. Nükleusta TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörleri ile ilişkiye girerek sayıları yüzlerce olan hedef genlerin anlatımlarını etkiler (8, 9).

Önceki çalışmalarımızda T-ALL'de, WNT sinyal ileti yolağı aktivasyonunu mRNA düzeyinde saptamıştık. Bu çalışmada PLA yöntemini kullanarak WNT aktivasyonu sürecindeki protein anlatımlarını ve kilit protein-protein (aktif β -katenin ve özgün hedef molekül olan Axin 2) etkileşimlerini göstermeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre kültürü ve hücrelerin hazırlanması

Bir olgun dönem T-ALL hattı olan Jurkat, %10 FCS (fetal calf serum), penisilin-streptomisin (50U/mL; Invitrogen Life Sciences, USA) içeren RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, USA) besi yerinde, 37°C de %5 CO₂ etüvde büyütülmüştür. Elde edilen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra, 1X10⁶/ml olacak şekilde sulandırılıp sitosantrifüj (Thermo Scientific) yardımı ile lamların üzerine yapıştırılmıştır. Hücreler %0.5 paraformaldehid ile gece boyu +40°C de fiksasyona bırakılmıştır.

Proksimiti Ligasyon Assay

In situ protein-protein interaksyonunu tespit edebilmek için geliştirilmiş olan in situ PLA tekniği, ucuna DNA primerleri takılmış antikörlerin, hedef proteinlere bağlanmasının ardından oligonükleotidlerin bağlanması ve çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Çoğaltılan ürüne komplementer, florofor işaretli hibridizasyon problemleri ile ürün, mikroskopik olarak görünür hale gelir. Çalışmamız "proximity ligation assay" PLA kiti kullanılarak yapılmıştır (Duolink, İsveç).

Cama yayılmış ve fikse edilmiş hücreler %70 lik soğuk etanolde ikinci bir fiksasyona tabii tutulur ve bloklama solüsyonu ile inkübe edilir. Sadece β -Katenin proteinini tespit etmek amacı ile 1:100 oranında dilüe anti-rabbit- β -catenin (Millipore, California, USA), sadece Axin2 protein ekspresyonunu görüntülemek amacı ile 1:750 oranında dilüe anti rabbit-Axin2 (Abcam, USA) antikörleri kullanılmıştır. Axin2-defosforile β Katenin beraberliğini göstermek amacı ile 1:50 oranında dilüe anti-active- β -catenin (mouse anti-ABC, Millipore, California, USA) ve 1:750 oranında dilüe anti rabbit-Axin2 (Abcam, USA) antikörleri birlikte kullanılmıştır. Tüm antikörler gece boyu +40°C de inkübe edilir. Hedef proteine bağlanmış antikörler 37°C'de 2 saat PLA problemleri ile inkübe edilerek işaretlenir. β -katenin ve Axin2 işaretlemesi için anti rabbit plus ve anti rabbit minus (Duolink, İsveç) problemleri,

defosforile β -Katenin-Axin2 birlikteliğinin tespiti için anti mouse minus- anti rabbit plus (Duolink, İsveç) problemleri kullanılmıştır. Hibridizasyon ve bağlayıcı ("connector") oligonükleotidlerin bağlanması takiben Phi29 DNA polimeraz yardımı ile komplementer bölgenin cam üzerinde amplifikasyonu gerçekleştirilir. Amplifikasyon aşamasının ardından 37°C'de 1 saat nükleus boyası (DAPI) ve Texas Red boyasını içeren deteksiyon solüsyonu ile inkübe edilerek sinyaller mikroskopta görünür hale getirilir (Detection Reagent, Duolink, İsveç). Son olarak ışımının uzun süreli olabilmesi için PLA sinyallerine uygun kapama solüsyonu ile kapatılır (Mounting Media, Duolink, İsveç). Amplifiye edilen sinyaller floresan mikroskobu ile uygun dalga boylarında görüntülenir (Leica CTR 6000, Leica, Wetzlar, Almanya).

SONUÇLAR

Çalışmamızda, Wnt yolağında anahtar role sahip (β -katenin ve hedef moleküllerinden olan AXIN2 ve her iki proteinin (aktif β -katenin -Axin2) ilişkisi, in situ PLA yöntemi ile bir T-ALL hücre soyu olan Jurkat hücrelerinde gösterildi (Şekil 1A-1B-1C).

β -katenin, hücre membranında ve sitoplazmada bolca bulunan bir proteindir. WNT aktivasyonu sonucu aktifleşen hücrelerde ise nükleus içine geç eder. Jurkat hücrelerinde β -katenin işaretlemesi sonucu proteinin hem sitoplazmada, hem de nükleus içinde biriktiği gözlenmektedir (Şekil 1A).

Axin2 proteini ise WNT aktivasyonuna işaret eden özgün bir hedefdir. Negatif düzenleyici olarak görev yapar ve β -kateninin bulunduğu yerlerde lokalize olur. Çalışmamızda, Jurkat hücrelerinde sitoplazma ve nükleusta Axin2 proteini gösterilmektedir (Şekil 1B).

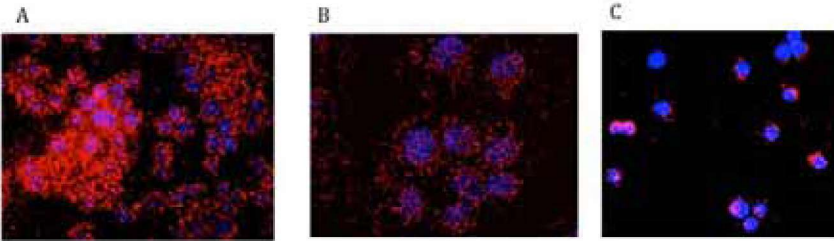
Aktive β -katenin ile birlikte yakın olarak yerleşmiş Axin2 proteininin nükleustaki beraberliği WNT aktivasyonunu kanıtlamaktadır (Şekil 1C).

Axin2 protein ekspresyonu; mavi ile boyalı alanlar DAPI boyası ile işaretli nükleus, kırmızı alanlar ise Texas Red ile boyanmış Axin2 PLA görüntüsü. B) β -katenin protein ekspresyonu; mavi ile boyalı alanlar DAPI boyası ile işaretli nükleus, kırmızı alanlar ise Texas Red ile boyanmış β -katenin PLA görüntüsü. C) Aktive β -katenin-Axin2 protein ekspresyonu; mavi ile boyalı alanlar DAPI boyası ile işaretli nükleus, kırmızı alanlar ise aktive β -katenin-Axin2 etkileşimini gösteren Texas Red işaretli PLA görüntüsüdür.

YORUM

Normal ve onkogenik süreçlerde, hücre apoptozu, göçü ve proliferasyonunun anlaşılabilmesi için hedef moleküllerin tek başına varlıklarının belirlenmesi yeterli değildir. Bu moleküllerin fonksiyonları ve hücre içindeki rollerinin aydınlatılabilmesi, ancak bu proteinlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin keşfedilmesiyle mümkün olabilecektir. Hücre içi protein-protein ilişkisini göstermek amacı ile birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan maya iki-hibrid tekniği ile hücre içi koşullarında bilinen bir proteinin, diğer proteinlerle olası ilişkisi DNA rekombinant teknolojisi kullanılarak sistematik olarak incelenebilir (10). Ancak bütün proteinlerin birbirlerine olan ilgisi bu yöntem ile belirlenememekle beraber, interaksiyonların hangi koşullar altında gerçekleştiği konusunda da bilgi verici değildir. Bir diğer yaklaşımda ise araştırılmak istenen protein, yeşil floresan protein (GFP) gibi floresan işaretli proteinler ile füzyona uğratarak canlı transforme hücrelerde görüntülenebilir (11). Bu yöntemin en önemli özelliği fiksasyon ve permeabilizasyon gerektirmeden, protein düzeyindeki değişimlerin dinamik olarak incelenebilmesidir. Ancak bu teknikler ile birçok değerli bilgiye ulaşılmış olsa da, hücre içi protein interaksiyonlarının karakterizasyonu için daha etkin yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda geliştirilen bir yöntem de in situ PLA yöntemidir. Bu metod uygun antikor varlığında, protein interaksiyonlarının, hücresel boyutta görüntülenebilmesine olanak sağlamaktadır (3). Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında çeşitli avantajlar sunduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Farklı türlere ait antikorlar kullanarak, yakın yerleşimli proteinlerin interaksiyonları araştırılabilir ve bütün doku, hücre tiplerinde uygulanabilir (5).

Wnt sinyali yokluğunda sitoplazmik β -katenin APC ve AXIN proteinleri ile etkileşir ve GSK3 β tarafından fosforillenerek yıkılır. WNT sinyal iletimi varlığında β -katenin'in defosforile şekilde sitoplazmada biriktiği ve sonrasında nükleusa geçerek transkripsiyon faktörlerine bağlandığı bilinmektedir (9). Aktive β -katenin'in nükleustaki hedef genlerinden biride Axin2 genidir. β -katenin'in Axin2 ile olan bu çift yönlü



Şekil 1: Jurkat hücre soyunda Axin2, β -katenin ve β -katenin-Axin2 PLA görüntüleri. A)

etkileşimi sayesinde hücre içerisindeki β -katenin hassas dengesi korunmaya çalışılmaktadır. Çalışmamızda, β -katenin ve Axin2 proteinlerinin anlatımlarının Jurkat hücrelerinde tespit edilmesinin ardından, ağırlıklı olarak nükleusta olmakla birlikte hem nükleus hem de sitoplazma içerisinde defosforile β -katenin-Axin2 birlikteliği PLA yöntemi ile belirlendi. Böylece, β -katenin-Axin2 ilişkisinin çekirdekte sonlanmadığı, Axin2'nin aktive β -katenine bağlanıp, bir taşıyıcı (shuttle) görevi üstlenerek, nükleustan sitoplazmaya geçişine de olanak sağladığı hücresel düzeyde gösterilmiş oldu. Nükleustaki β -katenin-Axin2 birlikteliği Wnt yolağının aktifliğini işaret etmektedir. Daha önce yapmış olduğumuz Wnt sinyal ileti yolu mRNA çalışmalarına paralel olarak, bu çalışmamızda T-ALL hücre soyunda artmış Wnt yolak aktivasyonunun hücre içerisindeki lokalizasyonu ile protein düzeyinde belirlememiz, T-ALL'de bozulmuş Wnt regülasyonunu varlığını

düşündürmektedir. WNT yolağının bozulmuş aktivasyonu meme, pankreas, kolon gibi birçok kanser türünde karsinogenez gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (6, 8). Bundan sonraki çalışmalarımızda, T-ALL hastalarına ait primer tümör hücrelerinde bu interaksyonu gösterip, WNT yolak aktivasyonu ve bu aktivasyonun hangi hedef proteinler üzerinden gerçekleştiğini saptayarak, bu yolağın lösemi patogenezine ne şekilde katkıda bulunduğunu açıklayabilmeyi amaçlamaktayız.

Alınan Destekler: TÜBİTAK (Proje no: 106S112) ve İstanbul Üniversitesi BAP (Proje no: 5785) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science*. 2006;312:1175-1178.
2. Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:473-483.
3. Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Soderberg O. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics*. 7:401-409.
4. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006;3:995-1000.
5. Soderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, Landegren U. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods*. 2008;45:227-232.
6. Nusse R. The Wnt gene family in tumorigenesis and in normal development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;43:9-12.
7. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell*. 1992;69:1073-1087.
8. Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*. 2004;48:477-487.
9. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006;281:22429-22433.
10. Kaiser P, Meierhofer D, Wang X, Huang L. Tandem affinity purification combined with mass spectrometry to identify components of protein complexes. *Methods Mol Biol*. 2008;439:309-326.
11. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509-544.