

A humán metasztázis inhibitor *nm23* géncsalád *C. elegans* ortológjainak genetikai analízise

OTKA zárójelentés

A humán *nm23* (mai elnevezése *nme*) géncsalád tagjai nukleozid-difoszfát kinázokat (NDPK) kódolnak. A 10 humán Nm23 izoforma (H1-H10) közül az Nm23-H1 volt az elsőként azonosított metasztázis inhibitor. Többféle ráktípus esetében (emlő-, gyomor-, méhnyakrák, májdaganat és melanóma esetében) a megnövekedett metasztatikus potenciál korrelációt mutatott az NM23-H1 izoforma csökkent expressziójával. Ez a korreláció számos tumor típus esetében azonban nem ilyen egyértelmű, sőt bizonyos esetekben, mint pl. petefészekrák vagy prosztatarák, a magas Nm23-szint a rossz prognózis előjelének bizonyul, vagyis ezekben a szövetekben valószínűsíthető az Nm23 onkogén funkciója. Az intenzív biokémiai kutatások ellenére még ma is ismeretlenek azok a mechanizmusok, amelyek segítségével az NM23-H1 fehérje e hatásait kifejti.

A fonálféreg *Caenorhabditis elegans*ban három NDPK paralógot azonosítottunk (*F25H2.5*, *F55A3.6* és *Y48G8AL.15* ORF-ek). Kutatási tervem szerint reverz genetikai módszerek felhasználásával tárom fel az *nm23* paralógok különböző szignalizációs útvonalakban betöltött szerepét a *Caenorhabditis elegans* gonád- és vulvafejlődésében illetve kitüntetett blaszt sejtek migrációja során. Elsőként az *nm23-H1* ortológ *ndk-1* (nucleoside-diphosphate-kinase-like 1) gén (ORF: *F25H2.5*) genetikai analízisét végeztük el az *ndk-1(ok314)* mutáns allélt hordozó állatok karakterizálásával ill. RNSi vizsgálatok segítségével. Az *ok314*-es allél megszekvenálása során kiderült, hogy ez az allél 1157 bp-nyi deléciót hordoz, amely magában foglalja az egész open reading frame-et és 523 bp-t az upstream illetve 34 bp-t a downstream nemkódoló régióból. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy az *ok314* egy erős funkcióvesztéses illetve null allél. A homozigóta mutáns állatok sterilek, illetve abnormalis, kitüremkedő vulvával rendelkeznek.

Az *ndk-1* gén expressziós mintázatának elemzése céljából ballisztikus transzformációval állítottunk elő olyan transzgenikus nematóda vonalakat, amelyek transzkripciós illetve translációs NDK-1::GFP konstrukciókat hordoztak. Az NDK-1::GFP minden egyedfejlődési stádiumban detektálható, az embrionális kortól a négy lárvastádiumon keresztül a felnőttig. Az NDK-1::GFP expresszió megfigyelhető az idegrendszer számos sejtjében, a hasdúcúcláncban, a hipodermisz és a testfal izomzatának sejtjeiben illetve a vulvában. A translációs konstrukcióval szerettük volna komplementálni a steril *ok314* homozigóta null mutánsokat, ami ballisztikus transzformációval sikertelen volt, mivel nem tudtuk bejuttatni a transzgént a csíravonalba. Ezért a translációs konstrukciót az új MosSCI (Mos1 mediated Single Copy gene Insertion) módszerrel jutattuk be egy kópiában a csíravonalba, ahol a transzgén expresszálódott és 90%-ban a mutáns fenotípust menekítette, vagyis sikeres komplementációt eredményezett.

Részletes elemzésnek vetettük alá az *ok314* mutánsok kitüremkedő vagy protruding vulváját (Pvl fenotípus). A vad típusú hermafroditák vulváját 22, DIC optikával jól elkülöníthető sejt építi fel, amelyek speciális sejtsors markerekkel L4 lárvastádiumban megjelölhetők (az L4 lárvastádiumban már mind a 22 sejt megjelenik, az osztódások lezajlottak, viszont a későbbi

felelős vulva kialakulásához szükséges sejt-fúziós és sejt-migrációs események még nem kezdődtek el, vagyis a vulvasejtek még elkülöníthetők, ezért ez a stádium a legalkalmasabb az osztódások eredményeként létrejött sejtek jelenlétének vizsgálatára). A sejt-sors markerekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az *ndk-1* null mutánsok vulváját 22-nél kevesebb (átlagosan 19-20) sejt építi fel, ami utalhat a vulva indukció zavarára. Ezért a továbbiakban kitüntetetten vizsgáltam az *ndk-1* EGFR/Ras/MAPK szignalizációs útvonalban betöltött szerepét, amely a *C. elegans* vulvaszövetének indukciójában, differenciációjában kulcsszerepet játszik. E szignalizációs útvonal bizonyos komponenseinek – így a *let-60/ras* génnek is – túlzott aktivitása a vulvát kialakító multipotens prekursor sejtek ektopikus aktiválásán keresztül több vulva kialakulásához, azaz multivulva (Muv) fenotípushoz vezet. Episztázis elemzésünkben az EGFR/Ras/MAPK útvonal alábbi Muv fenotípussal bíró mutánsaival dolgoztunk: *let-23/EGFR(gf)*, *let-60/ras(gf)*, *hs::mpk-1/MAPK;mek/MEK(gf)*, *lin-1/ETS(lf)*, *lin-31/forkhead(lf)*. E mutánsok és az *ndk-1(ok314)* keresztezésével kettős mutánsokat állítottunk elő, és analizáltuk a kettős mutánsok vulvaszámát. A *let-23(gf);ndk-1(ok314)* és a *let-60(gf);ndk-1(ok314)* kettős mutánsok vulvaszáma szignifikánsan kevesebb volt az egyszeres mutánsokéhoz képest, nem változott azonban a vulvaszám az útvonal downstream komponenseivel (*mek-2*, *mpk-1*, *lin-1*, *lin-31*) alkotott kettős mutánsokban. Ennek alapján az *ndk-1* az EGFR/Ras/MAPK útvonalon belül a *let-60/ras*-tól downstream vagy azzal párhuzamosan hat, viszont a *mpk-1/MAPK*-tól upstream helyezkedik el, hasonlóan a Ksr-1 *C. elegans* ortológjaihoz (*ksr-1*, *ksr-2*). A *ksr-1(lf);ksr-2(lf)* kettős mutánsok a *let-60/ras(gf)* mutánsok Muv fenotípusát szuppresszálják, azaz a kettős mutáns háttér redukált aktivitású Ras/MAPK szignál eredményez. Ebből következően a *ksr-1*, *ksr-2* gének vad típusú kópiájának jelenléte szükséges a Ras/MAPK kaskád aktivációjához vagy szinten tartásához. Episztázis analízisünk alapján arra következtetünk, hogy az *nm23-H1* ortológ *ndk-1* a *ksr-1/ksr-2* génekkel együtt hathat a Ras/MAPK szignál aktivációjában (a KSR fehérjék *scaffold* típusú fehérjék, amelyek vázat képeznek a Raf/MEK/ERK kinázok számára; a KSR állványfehérjék „töltöttségét” szabályozhatná foszforiláció útján a nukleozid-difoszfát kináz aktivitású Nm23-H1 izoforma). Munkahipotézisünk bizonyítása érdekében kettős mutánsokat állítottunk elő az *ndk-1(ok314)* és a *ksr* paralógok között.

A kettős mutánsok mindkét esetben szintetikus fenotípust mutattak, bennük a Ras fenotípusos jellegek felerősödtek. Ezt az alábbiakban a *ksr-2(lf);ndk-1(lf)* kettős mutánsok példáján demonstrálom.

Mind a *ksr-2(dx27)*, mind az *ndk-1(ok314)* mutáció sterilitást illetve kitüremkedő vulva fenotípust eredményez. A *ksr-2(dx27) ndk-1(ok314)* kettős mutánsok nem életképesek. A *ksr-2(dx27)/+ ndk-1(ok314)* genotípusú állatok ugyan eljutnak a felnőtt korig, de sterilek, kitüremkedő vulvájuk van és áttetszőek (azaz Clear, Clr), valamint az anus működésképtelensége miatt „szorulósos” (constipation, Con) fenotípust mutatnak. A Clr és Con fenotípusok a Ras/MAPK jelátvitelben résztvevő gének funkcióvesztéses mutánsainak jellegzetes fenotípusai.

A továbbiakban igazoltuk az NDK-1 és a KSR-2 fehérjék fizikai kölcsönhatását is: bakteriális illetve baculovírus rendszerben expresszáztattuk az NDK-1 és KSR-2 fehérjéket, és közöttük *in vitro pulldown* kísérlettel interakciót detektáltunk.

ksr-1(lf); *ksr-2(lf)* kettős mutánsokban az aktivált (difoszforilált) MAPK szint rendkívül alacsony, vagyis ezekben az állatokban megfigyelhető a MAPK/ERK aktiváció hiánya. Western blottal megmértük az *ndk-1(ok314)* mutánsok aktivált MAPK szintjét, és a várakozásnak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a szomatikus szövetekben az aktivált MAPK szint erősen redukált volt, míg a totál MAPK mennyisége a vad típussal összevethető volt. E kísérletek alapján tehát elmondhatjuk, hogy a nematóda szomatikus szöveiben az NDK-1, a KSR állványfehérjékhez hasonlóan, szükséges a MAPK aktiváció folyamatához. (A Western blot adatokhoz hozzáfűzném, hogy *C. elegans*ban az MPK-1/MAPK-nak van egy csíravonal-specifikus és egy szomatikus izoformája. *ndk-1(lf)* mutáns háttérben mindkét izoforma szintje alacsony volt az aktivált MAPK esetében, viszont MAPK aktivációra vonatkozó következtetést nem vonhattunk le a csíravonalra nézve, mivel ott a totál MAPK mennyisége is rendkívül lecsökken. Ezt azt sugallja, hogy a csíravonalban az NDK-1 szükséges lehet a MAPK termelődéséhez, ennek tisztázása azonban további kísérleteket kíván.)

A Ras/MAPK kaszkád egyik célgénje, az *egl-17/FGF* erősen redukált expressziót mutat *ndk-1(loss-of-function)* mutánsok vulvaszövetében, ami szintén azt bizonyítja, hogy a mutáns háttérben a Ras/MAPK jelátvitel gátolt.

Eredményeink összességében azt sugallják, hogy a kináz aktivitású NDK-1 aktiválja a Ras/MAPK jelátvitelt, foszforiláción keresztül módosíthatja a KSR állvány „töltöttségét”. A *C. elegans* vulvaszövet fejlődése szolgáltatja az első *in vivo* modellt az Nm23/KSR interakció értelmezéséhez. A Ras/MAPK út vonal NDK-1 általi aktiválása magyarázatot adhat arra, hogy bizonyos típusú tumorokban hogyan bír az Nm23 onkogén funkcióval.

Eredményeinket előadás formájában a “Genetikai Műhelyek Magyarországon” című IX. Minikonferencián (MTA Szegedi Biológiai Központ, 2010. szeptember 3.) mutattam be. Meghívott előadóként szerepeltem a 8th International Congress of the NDP Kinase/Nm23/awd Family – From Basic Science to Clinical Application című konferencián (Heidelberg, Németország, 2010. október 25.-28.; <http://ndpk-2010.uni-hd.de/programme.html>)

A Ras/MAPK jelátvitel NDK-1 általi aktiválásáról született kéziratot benyújtottam közlésre a PNAS című folyóirathoz. Mivel egyelőre a folyóirat választ várom az elbírálást illetően, szeretném kérni, hogy később, a publikáció esetleges elfogadása esetén pályázatom záró jelentését újra elbírálni, minősíteni szíveskedjenek.

Az NDK-1 sejt migrációban betöltött szerepét a nematóda gonád disztális csúcsi sejtjeinek (distal tip cells, DTC-k) vándorlása során követjük nyomon. Funkcióvesztéses *ndk-1* mutánsok csökkent DTC migrációt mutatnak, ráadásul különböző transzgenikus törzsekben detektálható az NDK-1::GFP expressziója a DTC-kben és a gonád tokját képező sejtekben is. Ez utóbbi sejtek a gonádban apoptózissal elpusztuló csírasejtek bekebelezéséért felelnek. A DTC migráció és az apoptózis bekebelezési fázisa analóg folyamatok, bennük átfedő gének vesznek részt, amelyek mindkét folyamatban a citoszkeleton átrendezését (is) végzik. Jelenleg

episztázis analízist végzünk az *ndk-1*-gyel és a DTC migráció és bekebelezés folyamatában bizonyítottan működő génekkel, hogy megértsük, hogyan funkcionál az *ndk-1* a citoszkeleton reorganizálásában. Adataink azt mutatják, hogy az NDK-1 a CED-10/Rac-tól downstream vagy azzal parallel és az ABL-1/Abl-tól upstream helyezkedik el a DTC migráció/bekebelezés folyamatában. Kimutattuk továbbá, hogy *ndk-1(lf)* mutáns háttérben mind a gonádban, mind az embriókban felhalmozódnak a be nem kebelezett apoptotikus testek. Ezek a kísérletek segíthetnek az Nm23 metasztázis gátló szerepének felderítésében. Az NDK-1 DTC migrációban és az apoptózis bekebelezési fázisában betöltött szerepéről szóló kézirat is előkészületben van.

A másik két *C. elegans nm23* paralóg vizsgálatát is elkezdjük.

Elkészítettük az *F55A3.6* és *Y48G8AL.15* ORF-ekre specifikus RNS interferencia konstrukciókat (ezek teljes cDNS-t tartalmaznak) és ezek segítségével csendesítettük az említett géneket. Az *Y48G8AL.15* gén esetében egy transzpozon inszerciókat hordozó *C. elegans* mutáns adatbankból (*Drosophila Mos1* transzpozonnal nematódán végzett mutagenézis screen eredményeként létrejött adatbank) sikerült olyan nematóda vonalat izolálni, amely homozigóta formában hordozza a *Mos1* elemet (Tc1/mariner család tagja) az *Y48G8AL.15* gén intronjában (kollaboráció Dr. Patricia Kuwabarával, University of Bristol). Mivel az így kapott transzpozon inszerciós mutáns vad fenotípusú, mobilizálni fogjuk a *Mos1* elemet annak érdekében, hogy a transzpozon excíziója után deléciós allélt kapjunk.