

NM23 (NME) homologok intra- és extracelluláris expresszió és funkció vizsgálata emlődaganatok metasztatikus folyamataiban

Buzás Edit, Sebestyén Anna, Vellai-Takács Krisztina

Semmelweis Egyetem; Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Semmelweis Egyetem, I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet – Molekuláris Onkológia MTA Támogatott Kutatócsoport

Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Embertani Tanszék

Összefoglalás

Az NM23 (tumor szupresszor, Non-Metastatic gene) homologjainak expresszió és funkcionális vizsgálata munkánk központi eleme. A fehérjecsald tagjainak legjobban ismert funkciója a sejtmigrációra gyakorolt negatív hatása, de számos egyéb regulációs szerepe is lehet (endoszómaképzés, apoptotikus bekebelezés, vezikula-transzport, celluláris energia, citoskeletális átrendeződések). Az MDA-MB-231 humán emlőcarcinoma sejtvonalban korábban igazoltuk a H1/H2 és NDK-1 hasonló, a migrációs képességet negatívan szabályozó funkcióit. Ezekben a genetikailag módosított sejtekben a túlexpresszált NM23 homologokkal összefüggésben a potenciális adhéziós, metasztatikus és anyagcserevátozásokat kívánjuk vizsgálni in vitro és in vivo. Célunk a **H1/H2 homologok daganatos környezetet is érintő hatásainak feltérképezése**, különös tekintettel a **daganatsejtek extracelluláris, a mikrokörnyezetet érintő hatásaira, terápiás érzékenységgel kapcsolatos metabolikus változásaira** és a háttérben zajló metabolikus szabályzók (TORC1, C2) fehérjeszintű aktivitás vizsgálatára. Tisztázni kívánjuk, hogy a **sérumban megjelenő NM23 valóban a daganatsejtekből származik-e, milyen mechanizmussal kerül a sejtekből az extracelluláris térbe** (exocitózis, exosomális, nekrotikus törmelék, apoptotikus testek) és **mi a szerepe**. A sérumból, tenyészetekből az NM23 H1/H2 vizsgálatát újonnan fejlesztett ELISA-val különböző sejtmintákból, sejtek felülűzőjéből, illetve az előbbiből frakcionált exosoma preparátumokból is tervezzük.

In vitro kezelésekkal (exosomaképzés farmakológiai gátlása vagy Rab27 silencing, Dynasore-exocitózis gátlása, medroxi-progeszteron-NM23 expresszió fokozása, NM23 tartalmú felülűző preparátumok) vizsgálunk: a sejtekből ürülő NM23 mennyiségét, lokalizációs változását, felderítve a kijutás módját, bioenergetikai hátterét, a sejtek metabolikus profiljának és mTOR aktivitásának változását. Az extracelluláris NM23 homologok más sejteket érintő hatásakor relokalizációs vizsgálatainkat a fúziós-MYC/FLAG TAG fehérjék segítenek ko-kulturákban (monocyta/makrofág sejtvonalban, monocyta-leukémia sejtvonalakban, fibroblasztokban) és in vivo xenograft modellben. Párhuzamosan paraffinos, esetleg fagyasztott primer és áttéti human emlőtumor mintapárokból, emlődaganatos betegek sérumból (új gyűjtés) vizsgálunk az NM23 H1/H2 expresszióját, elemeznék a sérumban és szöveti NM23 expresszió és a klinikai adatok összefüggéseit.

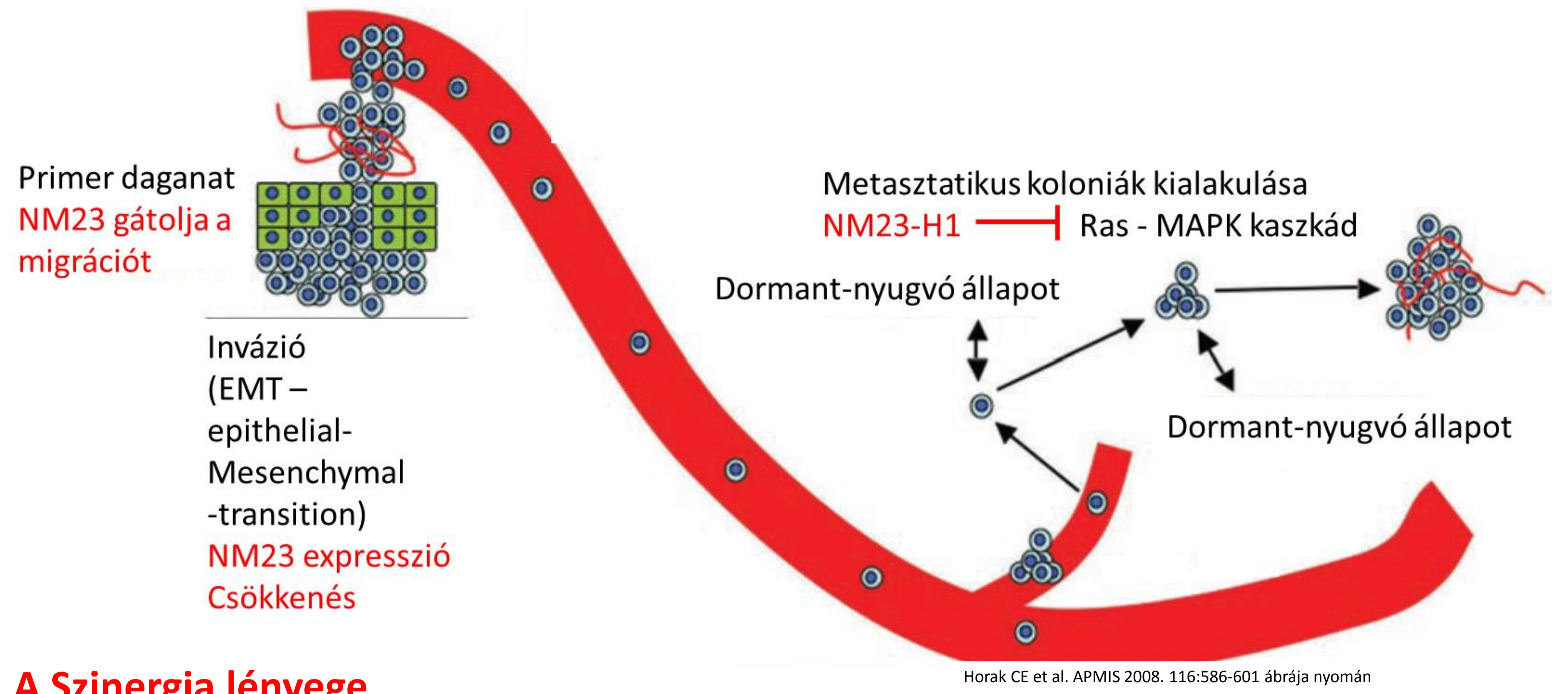
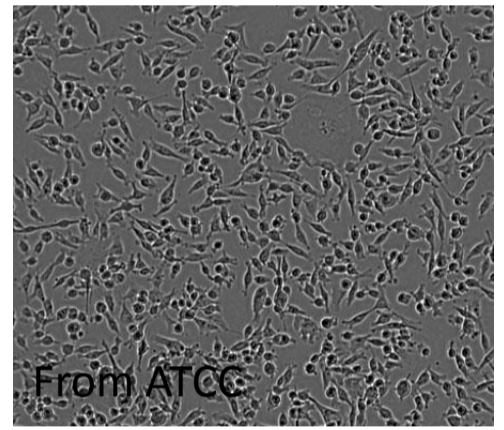
Fő kérdések:

NM23 H1-H2 izoformáinak funkcionális vizsgálata

- Lokalizációja (EC-IC-exosoma?)
- Extracelluláris térbe jutásának vizsgálata
- Metasztatikus képességre gyakorolt hatás
- Metabolikus hatás (glikolízis/TCA; PKM1/2; Akt/mTOR aktivitás)

Modell:

MDA-MB231 (ER-, PR-, HER2-; Tripla negatív) emlő carcinoma
Nm23 H1, H2, NDK1 izoforma transzfektánsok



A Szinergia lényege

Horak CE et al. APMIS 2008. 116:586-601 ábrája nyomán

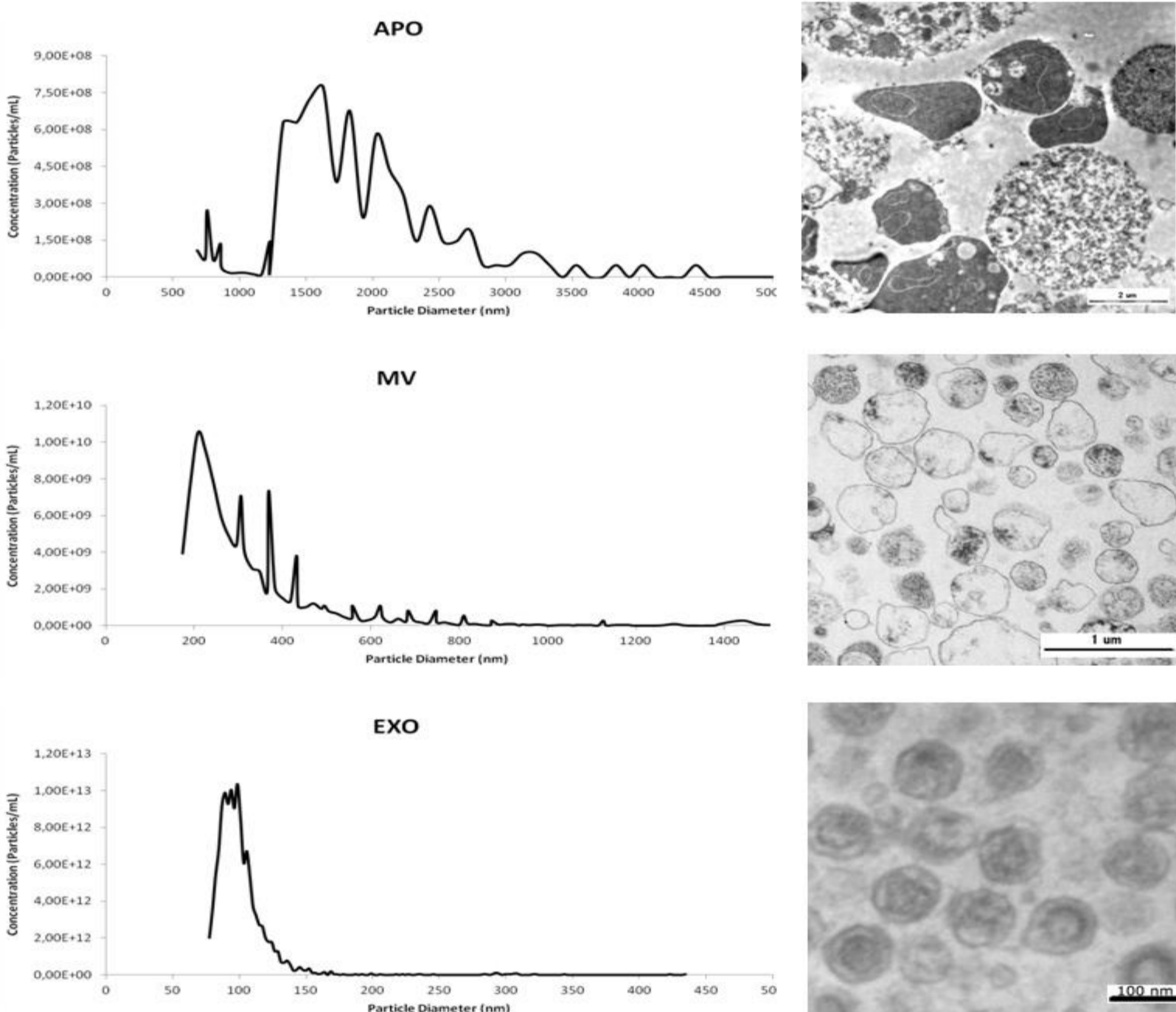
Buzás Edit
Semmelweis Egyetem
Genetikai, Sejt-,
és Immunbiológiai Intézet

Vezikula Munkacsoport
Felülűző vezikula frakcióinak jellemzése, izolálása, exosoma vizsgálatok

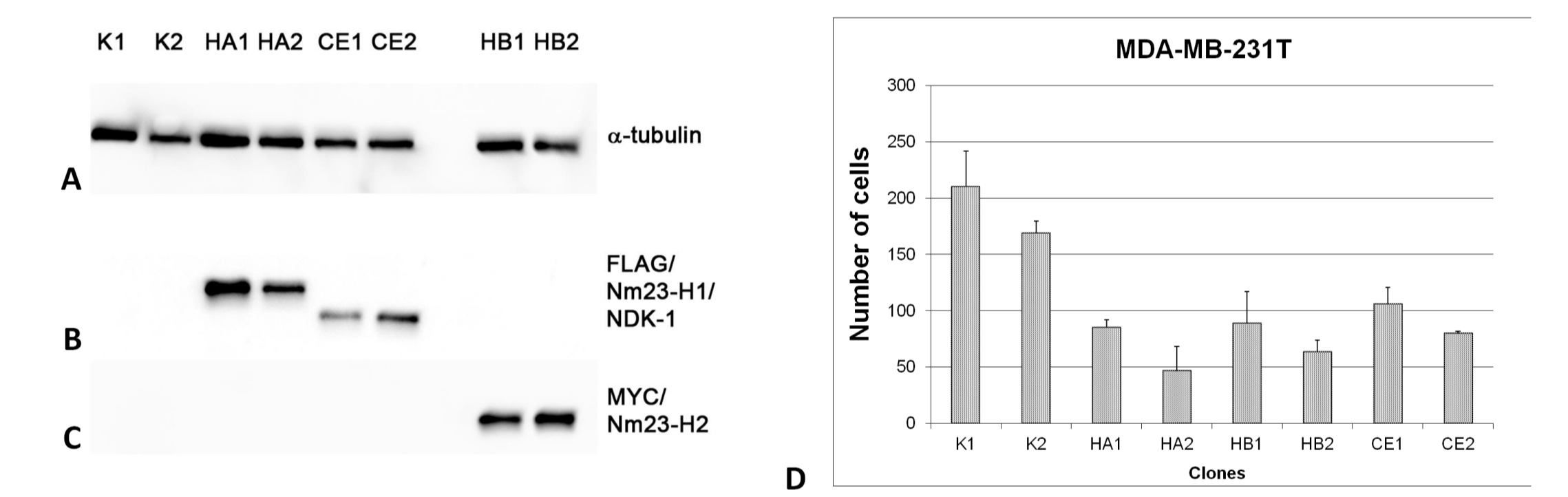
NDPK Munkacsoport
NM23 H1/H2-t overexpresszáló sejtvonalak, H1/H2 ELISA mérések, NDPK-Dynamin vizsgálatok, Apoptotikus clearance

Vellai-Takács Krisztina
Eötvös Loránd Tudomány Egyetem
Embertani Tanszék

Tumorbiológia - mTOR Munkacsoport
Sejtvonalak metabolikus jellemzése, mTOR aktivitás vizsgálatok, Ko-kulturák, in vivo xenograft modellek



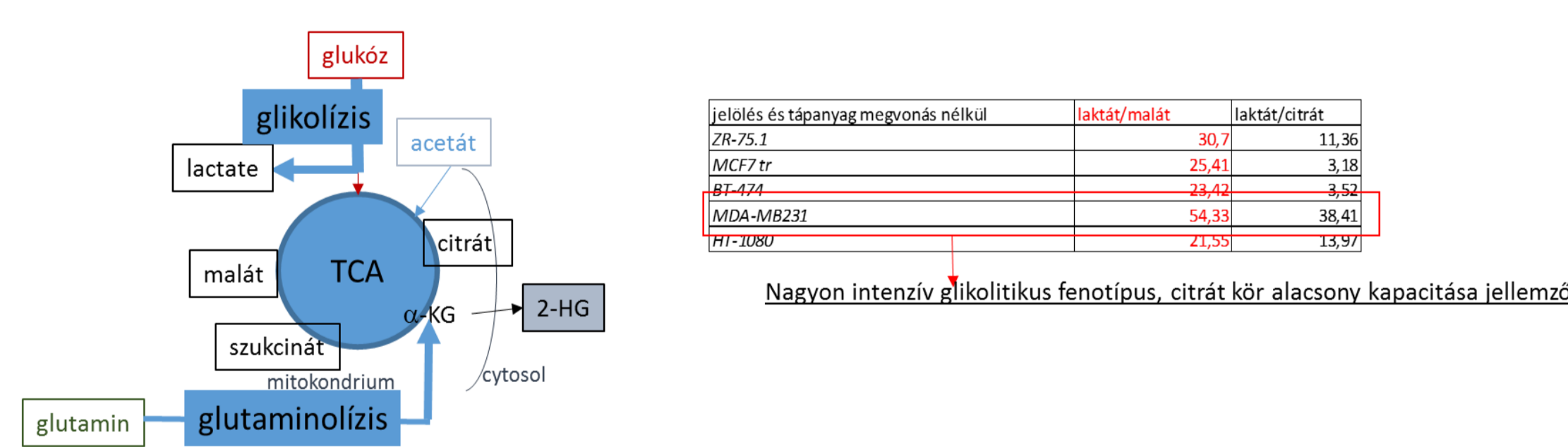
Extracelluláris vezikulák (apoptotikus testek (APO), mikrovezikulák (MV) és exosómák (exo) méreteloszlása és elektron mikroszkópos képe. Osteikoetxea X et al. PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0121184.



(A,B,C) MDA-MB231 H1, H2 és NDK-1 transzfektált sejtvonalakban az overexpresszált fehérjék kimutatása (A) Loading kontroll; (B) FLAG::NM23 H1 és FLAG::NDK1 kimutatása; (C) MYC::NM23 H2 kimutatása (Western blot) Fancsalszky L, ...Takács-Vellai K. PLoS One 2014. (D) MDA-MB231 H1, H2 és NDK-1 transzfektált sejtvonalak migrációs képessége a kontrollhoz képest csökken (Boyden kamrában migrált sejtek száma) K1, K2 kontrol vektor transzfektált HA1, HA2: NM23 H1, HB1, HB2 NM23 H2, CE1, CE2 NDK1 transzfektánsok

Sebestyén Anna
Semmelweis Egyetem
I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

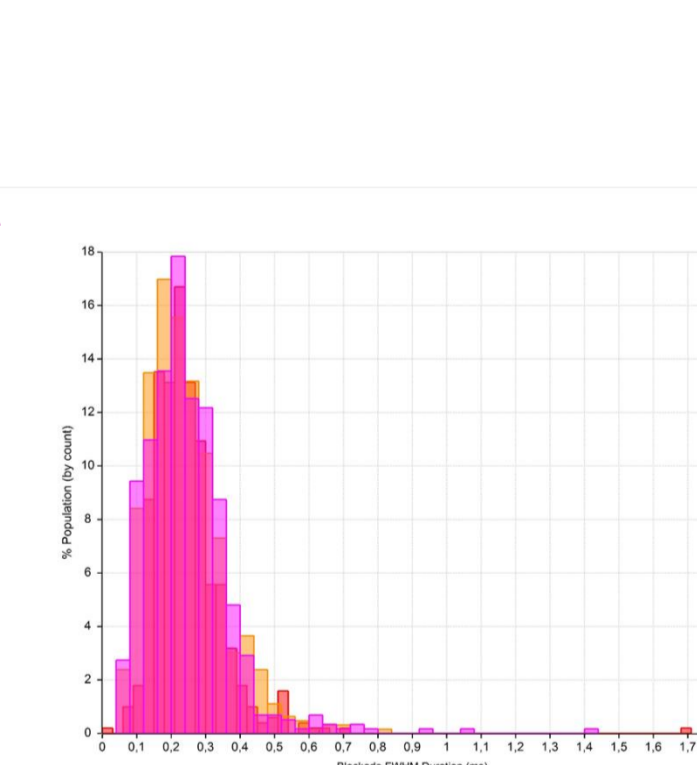
Jelölten és 13C glükóz vagy 13C acetát jelölést követő metabolit koncentráció meghatározása (LC-MS) segítségével a sejtek anyagcserejének jellemzése



Elsősorban daganatsejtek esetében informatív és levonható következtetések

- Jelölten laktát, malát mennyiség → erős glikolitikus fenotípus >> citrát köri aktivitás
- laktát>> és laktát/malát>> → glikolitikus fenotípus mellett jelentős citrát köri aktivitás
- laktát> és laktát/malát< → glikolitikus fenotípus mellett jelentős citrát köri aktivitás
- 13C glükóz vagy acetát jelölést követő metabolit koncentráció meghatározása
- 13C glükóz jelölt/jelölten laktát mennyisége → glikolízis aktivitására utal
- Citrátba vagy malátba beépülő szénatomok nagyobb száma → citrátkör nagyobb kapacitását mutatja

HT-1080 tumorsejtvonal exosomáinak méreteloszlása rapamycin kezelés előtt és után



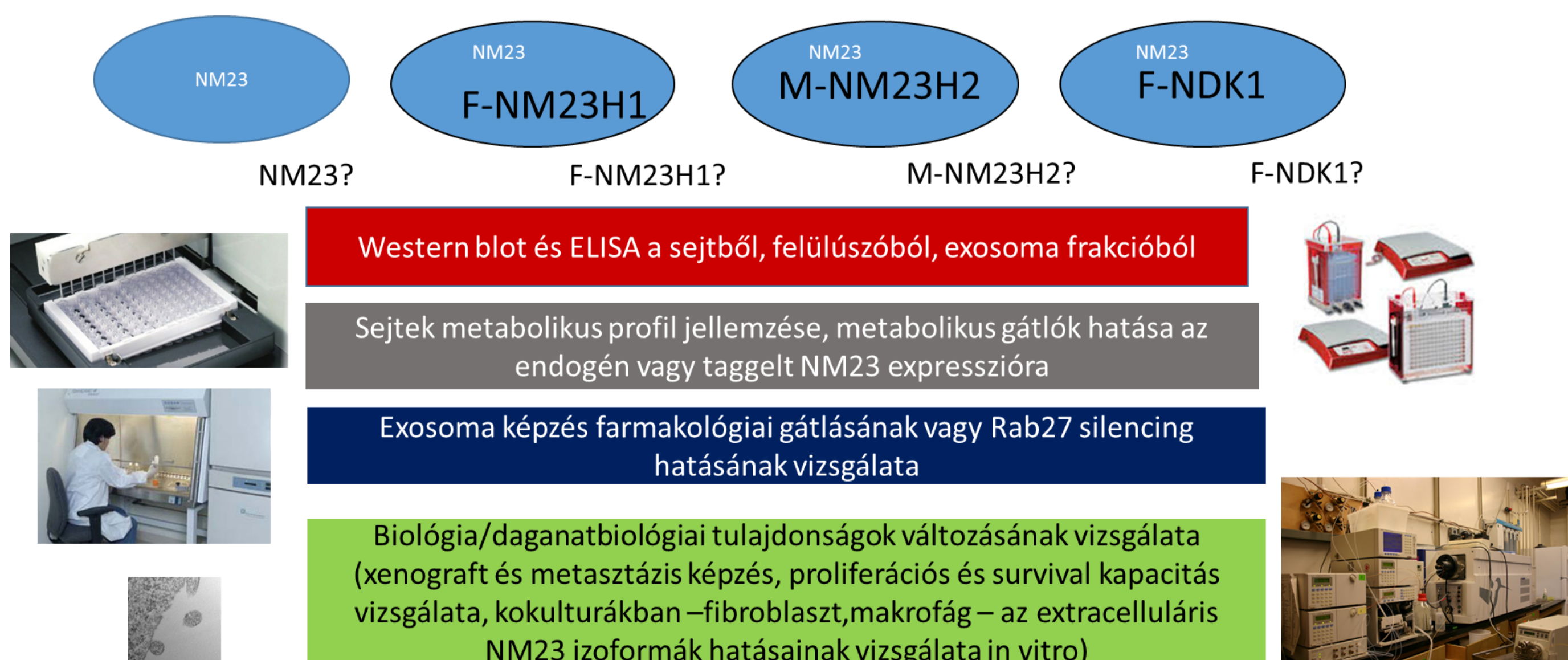
Metabolit koncentráció meghatározás előnyei (jelölt vagy jelölten szubsztrátok jelenlétében)

| Sejtvonalok | ng/millió sejt laktát (M+SD) | ng/millió sejt izoaktinát (13B) | ng/millió sejt malát (13A) | ng/millió sejt 2-HG (14B) | ng/millió sejt citrát (13C) |
|------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| HT-1080 72h Co jelölésben | 2793 | 110 | 196 | 2243 | 700 |
| HT-1080 72h + Rapamycin jelölésben | 1472 | 97 | 446 | 766 | 380 |
| ZR-75.1 jelölésben | 3682 | 178 | 219 | 0 | 323 |
| MDA-MB-231 jelölésben | 4235 | 13 | 77 | 10 | 110 |
| BT474 | 1649 | 137 | 70 | 0 | 467 |

1. Metabolit intracelluláris koncentráció jellemző a sejtek anyagcsere viszonyait
2. A metabolit koncentráció viszonyok meghatározása, adott sejtek jellemzését segíti, összefüggést mutathat a tumorsejtek metasztatikus viselkedésével, állapotváltozásával is
3. Adott kezelések gyorsan megváltoztathatják ezeket a koncentráció viszonyokat, amik tükrözik az anyagcsere változását, de akár a sejtek adott kezeléssel szembeni érzékenységét is
4. A sejtek exosomáiban ezek a metabolit koncentráció viszonyok ugyanúgy kimutathatók és feltérképezhetők a kezeléskor adott válaszoknak megfelelően változnak vagy rezisztencia esetén változatlanok
5. Onkometabolitok kimutathatósága

A modell sejtvonal, az MDA-MB231 metabolikus karakterisztikája: extrém emelkedett glikolitikus aktivitás és csökkent, minimális citrát kör kapacitás 2-hidroxi-glutarát (2-HG) onkometabolitot termeléssel

És, ami még jön...



Az extracelluláris NM23 használható-e a tumorprogresszió folyamatát mutató biomarkerként vagy terápiás targetként? Az exosomák, és képződésük mechanizmusa, a tumorspecifikus exosomák tartalmának vizsgálata segítheti-e a daganatok diagnózisát, illetve a terápia alatti monitorozását?

