**Az extracelluláris NM23 szerepe**

Az NM23-H1 (non-metastatic clone 23, H1 izoforma) fehérje volt az elsőként felfedezett metasztázis szuppresszor. Számos szolid tumortípus esetén igazolták az NM23-H1 alacsony szintjét vagy hiányát a metasztázisban. Emellett emlőkarcinómás, hematológiai eredetű tumoros és neuroblasztómás betegek szérumában is kimutatták az NM23 homológok jelenlétét. Célunk annak vizsgálata volt, hogy a szérumban detektálható NM23 milyen mechanizmussal kerül a tumorsejtekből az extracelluláris térbe és mi a szerepe. Modellként FLAG::NM23-H1-gyel, MYC::NM23-H2-vel és kontroll vektorral transzfektált MDA-MB-231T invazív emlőkarcinóma sejtvonalakat használtunk. Felülúszójukból extracelluláris vezikula frakciókat izoláltunk, amelyekben Western blottal és áramlási citometriával vizsgáltuk a fúziós fehérjék megjelenését. Eddigi kísérleteinkben MYC::NM23-H2-t overexpresszáló MDA-MB231T sejtekből származó mikrovezikula és exoszóma preparátumokban egyaránt sikerült kimutatnunk a fúziós fehérje jelenlétét. Tovább vizsgáljuk, hogy a tumorprogresszió során mikor juttatják ki a tumorsejtek az NM23-at az extracelluláris környezetbe, és lehetséges-e az NM23 izoformákat biomarkerként használni. NM23-transzfektált emlőkarcinóma sejtek és fibroblasztok ko-kultúrájában vizsgáljuk, hogy mi a jelentősége az extracelluláris NM23-nak a tumorsejtek és a mikrokörnyezet kommunikációjában.

**Szinergia összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

* *Adják meg a támogatott szinergia programjuk címét és szakmai fókuszpontját*

**Támogatott MedInProt Szinergia IV pályázat 2015:**

**Cím: NM23 (NME) homológok intra- és extracelluláris expressziójának és funkciójának vizsgálata emlődaganatok metasztatikus folyamataiban**

Szakmai fókuszpont: Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben*,*

* Adják meg a szinergia program keretében együttműködő partnerek nevét, tudományos fokozatát, tudományos besorolását, e-mail címét.
1. **Együttműködő partnerek**

**Dr. Buzás Edit** (MD, PhD, DSc) – Semmelweis Egyetem, ÁOK Genetika, Sejt- és Immunbiológia Intézet; Intézetvezető egyetemi tanár

edit.buzas@gmail.com, buzas.edit@med.semmelweis-univ.hu

**(Hunyadyné) Dr. Sebestyén Anna** (PhD) - Semmelweis Egyetem, ÁOK I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Tudományos főmunkatárs

hsebanna@gmail.com, anna@korb1.sote.hu

**Vellainé Dr.Takács Krisztina** (PhD) – Eötvös Loránd Tudományegyetem, TTK Embertani Tanszék, Tanszékvezető egyetemi docens

takacsve@gmail.com; takacsk@falco.elte.hu

* *Csatolják a MedInProt programnak köszönhetően elkészült tudományos közleményeik****,*** *szakmai megjelenésük**bibliográfiai adatait, valamint e dokumentum pdf-ét****.*** *Minden publikáció esetében fejtsék ki max. 2 mondatban a MedInProt relevanciáját.*

**Projektünket, előzetes eredményeinket az alábbi konferenciákon mutattuk be előadás formájában:**

An investigation of extracellular NM23. Zsolt Farkas, Anna Sebestyén, Edit I. Buzás, Maja Herak Bosnar, Zoltan Prohaszka and Krisztina Takács-Vellai. The Inter Congress of the International Union of Anthropological and Ethnological Sciences, 2016.05.04-09, Dubrovnik, Croatia.

The *C. elegans* group I NDPK homologue NDK‐1 functions together with DYN‐ 1/Dynamin in apoptotic engulfment and clearance. Zsolt Farkas, Xianghua Liu, Sung Yun Jung, Muhammed Afaq Shakir, Tamás Végh, Mathieu Boissan, Jun Qin, Zheng Zhou and Krisztina Takacs-Vellai Explore NDPK 2016, 2016. 10.09.-13., Dubrovnik, Croatia

Gordon Research Conference: 2016 Extracellular Vesicles: Biologic Effects and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles August 21-26, 2016: Sunday River Resort, Newry, Maine, USA, Edit Buzas invited speaker

Extracellular Vesicles in Inflammation, Krems, Austria, június 24, 2016. Edit Buzas invited speaker

[European Society for Artificial Organs: ESAO](https://www.google.hu/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjB087CocrRAhVC1ywKHYo3Da4QFggjMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.esao.org%2F&usg=AFQjCNE1KRa7TCwsGGor8P1Ygjlk8Wjq-Q&sig2=6N-4_Moa6veHyLrsvHZUvA) Meeting (Warsaw, Sept. 14-17th, 2016), Edit Buzas invited speaker

Hujber Z., Petővári G., Szoboszlai N., Oláh J., Dankó T., Nagy N., Jeney A., *Sebestyén A.*: Rapamycin influences the growth and the metabolism of IDH mutant fibrosarcona cells, ISCaM 2016 - Metabolic Networks in Cancer 2016. október 26-29. Brüsszel, Belgium

Sebestyén Anna - Daganatos sejtek túlélését befolyásoló jelátviteli zavarok metabolikus összefüggései – Hugonnai emlékérem díjátadó előadás 2016. november 30. Budapest

**Az elmúlt pályázati időszakban az alábbi publikációk születtek:**

Sebestyén A, Hujber Z, Jeney A, Kopper L: Tumormetabolizmus. Klinikai Onkológia 2016: 3:127-134 Összefoglaló magyar nyelvű közlemény

Nagy N, Hajdu M, Márk Á, Király PA, Tóth M, Dankó T, Csóka M, Sebestyén A: The growth inhibitory effect of rapamycin in Hodgkin-lymphoma cell lines characterized by constitutive NOTCH1 activation. Tumour Biol. 2016 Oct;37(10):13695-13704.

Krencz I, Sebestyén A, Fábián K, Márk Á, Moldvay J, Khoor A, Kopper L, Pápay J. Expression of mTORC1/2-related proteins in primary and brain metastatic lung adenocarcinoma. Hum Pathol. 2016 Dec 23. pii: S0046-8177(16)30354-9. doi: 10.1016/j.humpath.2016.12.012. [Epub ahead of print]

Sticz T, Molnár A, Márk Á, Hajdu M, Nagy N, Végső G, Micsik T, Kopper L, Sebestyén A. mTOR activity and its prognostic significance in human colorectal carcinoma depending on C1 and C2 complex-related protein expression. J Clin Pathol. 2016 Oct 11. pii: jclinpath-2016-203913. doi: 10.1136/jclinpath-2016-203913. [Epub ahead of print]

[Single particle analysis: Methods for detection of platelet extracellular vesicles in suspension (excluding flow cytometry).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28033028) Buzás EI, Gardiner C, Lee C, Smith ZJ. Platelets. 2016 Dec 29:1-7.

[The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989272) Lässer C, Théry C, Buzás EI, Mathivanan S, Zhao W, Gho YS, Lötvall J. J Extracell Vesicles. 2016 Dec 16;5:34299.

[A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057937)Pallinger E, Bognar Z, Bodis J, Csabai T, Farkas N, Godony K, Varnagy A, Buzas E, Szekeres-Bartho J. Sci Rep. 2017 Jan 6;7:39927.

[A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27680301) Vogel R, Coumans FA, Maltesen RG, Böing AN, Bonnington KE, Broekman ML, Broom MF, Buzás EI, Christiansen G, Hajji N, Kristensen SR, Kuehn MJ, Lund SM, Maas SL, Nieuwland R, Osteikoetxea X, Schnoor R, Scicluna BJ, Shambrook M, de Vrij J, Mann SI, Hill AF, Pedersen S. J Extracell Vesicles. 2016 Sep 27;5:31242.

[The Role of Extracellular Vesicle and Tunneling Nanotube-Mediated Intercellular Cross-Talk Between Mesenchymal Stem Cells and Human Peripheral T Cells.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27596268) Matula Z, Németh A, Lőrincz P, Szepesi Á, Brózik A, Buzás EI, Lőw P, Német K, Uher F, Urbán VS. Stem Cells Dev. 2016 Dec 1;25(23):1818-1832.

[[Extracellular vesicles and their role in hematological malignancies].](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27569460) Rzepiel A, Kutszegi N, Cs Sági J, Kelemen A, Pálóczi K, F Semsei Á, Buzás E, Erdélyi DJ. Orv Hetil. 2016 Aug;157(35):1379-84.

[Immune Recognition of Citrullinated Proteoglycan Aggrecan Epitopes in Mice with Proteoglycan-Induced Arthritis and in Patients with Rheumatoid Arthritis.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466816)

Markovics A, Ocskó T, Katz RS, Buzás EI, Glant TT, Mikecz K. PLoS One. 2016 Jul 28;11(7):e0160284. doi: 10.1371/journal.pone.0160284.

[Radiolabeling of Extracellular Vesicles with (99m)Tc for Quantitative In Vivo Imaging Studies.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27310303)

Varga Z, Gyurkó I, Pálóczi K, Buzás EI, Horváth I, Hegedűs N, Máthé D, Szigeti K.

Cancer Biother Radiopharm. 2016 Jun;31(5):168-73.

[Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087061) Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman KV, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlágh B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. Sci Rep. 2016 Apr 18;6:24316.

[Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26978483)

Fais S, O'Driscoll L, Borras FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, Carvalho J, Cordeiro da Silva A, Del Portillo H, El Andaloussi S, Ficko Trček T, Furlan R, Hendrix A, Gursel I, Kralj-Iglic V, Kaeffer B, Kosanovic M, Lekka ME, Lipps G, Logozzi M, Marcilla A, Sammar M, Llorente A, Nazarenko I, Oliveira C, Pocsfalvi G, Rajendran L, Raposo G, Rohde E, Siljander P, van Niel G, Vasconcelos MH, Yáñez-Mó M, Yliperttula ML, Zarovni N, Zavec AB, Giebel B.

ACS Nano. 2016 Apr 26;10(4):3886-99.

[Unique patterns of CD8+ T-cell-mediated organ damage in the Act-mOVA/OT-I model of acute graft-versus-host disease.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27137185) Érsek B, Lupsa N, Pócza P, Tóth A, Horváth A, Molnár V, Bagita B, Bencsik A, Hegyesi H, Matolcsy A, Buzás EI, Pós Z. Cell Mol Life Sci. 2016 Oct;73(20):3935-47.

[Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith?](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26872404)

Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, Vukman KV, Buzás EI.

J Physiol. 2016 Jun 1;594(11):2881-94.

A tumorok kialakulásához és terjedéséhez, a sejtek túlélését segítő anyagcsere változások vizsgálatát az NM23 transzfektált sejtekben is megkezdtük, ehhez hasonló vizsgálatainkból pedig többet sikerült befejeznünk és közölnünk az elmúlt évben Sebestyén Anna csoportjában. Buzás Edit csoportjában, a vezikulák biológiai és potenciális daganatbiológiai szerepéről és vizsgálatának lehetőségéről számos további közlemény és kongresszusi előadás készült, ezeknek a tapasztalatoknak és a technikáknak az alkalmazása nagyban segítette és segíti a megkezdett EC NM23 megjelenését és funkcióját érintő közös vizsgálatainkat. Párhuzamosan a vizsgálataink több konferencián is bemutatásra kerültek az előbbi témákban a MedinProt támogatás feltüntetésével.

*Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódott az alább megadott MedinProt* ***fókuszpontok*** *legalább egyikéhez (max. 300 szó)****.***

***A kutatási együttműködés kapcsolódása megadott MedinProt - Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben – fókuszponthoz***

Az NM23 (legújabb nevezéktan szerint NME), az elsőként azonosított humán metasztázis szupresszor fehérje különböző homológjainak expresszió és funkcionális vizsgálata a elsődleges célunk. Ezek a fehérjék a metasztatikus kaszkád számos pontján befolyásolhatják a daganatos progressziót. Az **NM23 legjobban jellemzett izoformájának a H1-esnek sejtmigrációt gátló hatását számos tanulmány igazolja, de a H2 homológnak többen daganattípus függően onkogén hatásokat is tulajdonítanak**. Érdekesek azok az adatok, amelyek a fehérje **szérumszintjének** emelkedését mutatják a **rossz prognózissal** párhuzamosan. Utóbbinak kitüntetett szerepe lehet a daganatos mikrokörnyezet alakításában, de termelésének jelátviteli szabályozásáról, az extracelluláris térbe kerülésének mechanizmusáról és hatásáról nincsenek adatok. Az NM23 H1/H2 nukleozid difoszfát kináz (NDPK) aktivitásán keresztül a membrán átrendeződésekhez, Dynamin vezérelt vezikula transzport folyamatokhoz szükséges GTP-t biztosít, ezen keresztül is hatással van a sejt energiaháztartására. Emellett modell kísérletekben tapasztalták, hogy az AMPK - celluláris energetikai szenzor – gátolja az NDPK aktivitást kedvezőtlen energetikai feltételek esetén. A daganatsejtekben gyakori jelátviteli hálózatot érintő regulációs zavarok egyik markere az emelkedett mTOR aktivitás. Az mTOR, mint jelátviteli csomópont több szempontból szabályozza a sejtfunkciókat, így az anyagcserefolyamatokat is. Az NM23 függő celluláris, metasztatikus folyamatokban az mTOR szabályozó szerepe még ismeretlen terület. Az NM23-nak az apoptózis folyamatában is tulajdonítanak szerepet. *C. elegans*-on végzett kísérleteinkben azt találtuk, hogy az NM23 homológ NDK-1 az apototikus testek bekebelezését segíti (Dynamin-NDPK együttműködésén keresztül), hiányában a bekebelezés, “eltakarítás” zavart szenved. Ha ez pl. tumoros szövetekben fordul elő az a mikrokörnyezetben a gyulladásos folyamatoknak kedvez, amely a tumorok típusának függvényében befolyásolja a progressziót.

Mindezek alapján az NM23 intracelluláris és extracelluláris folyamatokat szabályozó szerepének több szempontú vizsgálata új mechanizmusokat tárhat fel, amelyek hasznosíthatóak akár a daganatbiológia, akár az immunológia területén, különös tekintettel a citoszkeletális rendszer regulációjára (migráció, metasztázis), a különböző escape mechanizmusokra.

*Foglalják össze* ***közérthetően*** *szinergia programjuk, és közös munkájuk eredményeit (max. 300 szó).*

Az NM23 homológjainak expresszió és funkcionális vizsgálata munkánk központi eleme. A fehérjecsalád tagjainak legjobban ismert funkciója a sejtmigrációra gyakorolt negatív hatása, de számos egyéb regulációs szerepe is lehet (endoszómaképzés, apoptotikus bekebelezés, vezikula-transzport, celluláris energia, citoszkeletális 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 túlexpresszáltatott NM23 homológokkal összefüggésben a potenciális adhéziós, metasztatikus és anyagcsereváltozásokat kívánjuk vizsgálni *in vitro* és *in vivo*. Célunk a H1/H2 homológok daganatos környezetet is érintő hatásainak feltérképezése, különös tekintettel a daganatsejtek extracelluláris, a mikrokörnyezetet érintő hatásaira, terápiás érzékenységgel kapcsolatos metabolikus változásaira. Tisztázni kívánjuk, hogy a szérumban megjelenő NM23 valóban a daganatsejtekből származik-e, milyen mechanizmussal kerül a sejtekből az extracelluláris térbe és mi a szerepe.

**Pályázatunk során beállítottuk a FLAG::NM23-H1-gyel, MYC::NM23-H2-vel és kontroll vektorral transzfektált MDA-MB231T sejtvonal kultúrákat, az egyes vonalakból származó sejtextraktumokban ellenőriztük a megfelelő fúziós fehérjék expresszióját. Felülúszóikból extracelluláris vezikula frakciókat izoláltunk, amelyekben Western blottal és áramlási citometriával vizsgáltuk a fúziós fehérjék megjelenését. Eddigi kísérleteinkben MYC::NM23-H2-t overexpresszáló MDA-MB231T sejtekből származó mikrovezikula és exoszóma preparátumokban egyaránt sikerült kimutatnunk a fúziós fehérje jelenlétét.** Tovább vizsgáljuk, hogy a tumorprogresszió során mikor juttatják ki a tumorsejtek az NM23-at az extracelluláris környezetbe (lehetséges-e az NM23 izoformákat biomarkerként használni). NM23-transzfektált emlőkarcinóma sejtek és fibroblasztok ko-kultúrájában vizsgáljuk, hogy mi a jelentősége az extracelluláris NM23-nak a tumorsejtek és a mikrokörnyezet kommunikációjában.

Az extracelluláris NM23-H1 felülúszókban, vezikula frakciókban, később szérum mintákban történő detektálásához sandwich ELISA rendszert fejlesztünk, a rendszer beállításához szükséges ellenanyagok tesztelése folyamatban van.

**A modell sejtvonal, az MDA-MB231 metabolikus karakterizálását elvégeztük: extrém emelkedett glikolitikus aktivitást és csökkent, minimális citrát kör kapacitást detektáltunk, 2-hydroxi-glutarát (2-HG) onkometabolit termeléssel. MDA-MB231 xenograftot alakítottunk SCID egerekben, ezeknek az egereknek szövettani és szérum mintáit tovább vizsgáljuk (NM23 expresszió vizsgálatok többféle technikával, illetve metasztázisok, későbbiekben metasztázis modellek vizsgálata is lehetséges).**

*Értékeljék és véleményezzék közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) (max. 200 szó).*

Nagyon sok közös metodikai és kutatási problémát tudtunk közösen megvitatni, amelyekre nem lett volna alkalmunk a pályázat nélkül, pl. olyan LC-MS méréseket tudtunk megkezdeni, amelyekben a sejtek extracelluláris vezikuláinak nemcsak fehérje és RNS, hanem metabolit tartalmát is megvizsgáltuk a sejtek IC metabolit tartalmával összevetve. Ehhez a projektben használt sejtek és a 3 kutatócsoport metodikáit hangoltuk össze és így a 3 csoport megismerkedett olyan eljárásokkal (EC vezikula izolálás, LC-MS minta előkészítések, mérések és azok lehetőségei vezikulák jellemzésében, EC fehérjék mennyiségi vizsgálatai, modell rendszerekben - pl. *C. elegans* - az alábbi technikák alkalmazásának bevezetése), amelyek megfelelő alkalmazása elengedhetetlen jövőbeni munkáinkhoz. Annak érdekében, hogy az ilyen projektek könnyebben megvalósulhassanak, előnyt jelentene a résztvevő hallgatók , illetve a kísérletek kivitelezésében, mérésekben résztvevő személyek támogatása, amivel a hosszabbtávú munkacsoportokhoz tartozásukat lehetne elősegíteni.

*Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. (max. 200 szó)*

A MedInProt programnak köszönhetően sokkal alaposabban megismertük egymás témáit és ennek kapcsán az együtt-gondolkodással rengeteg új ötletet fogalmaztunk meg ès sok szempontból tudjuk segíteni a 3 kutatási terület (genetika-sejtbiológia-onkológia) együttműködését. Számos új projekt ötletünk született, amelyeken együtt dolgozunk, hallgatóink is segítik egymás munkáját, igazán gyümölcsözô új együttműködéseink születnek. Már csak a kísérletek végrehajtásához szükséges dologi források előteremtése szükséges a jelenlegi ínséges pályázati időkben, de együtt ez is könnyebb lesz. A projekt konferencián mások munkáival is megismerkedtünk, a fehérjék funkcionális, lokalizációs, strukturális vizsgálata számos csoporttal köthet össze bennünket, ezzel új, a jelenlegi fő érdeklődéseinkhez kötôdô lehetőséget ismertünk meg. A kezdeményezés remek. Köszönjük!

***A szinergizmus szakmai fókuszpontjai, kiemelt kutatási témák****:*

1. *Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben,*
2. *NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében,*
3. *Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamat(ok)ban,*
4. *Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében.*