

## **Új citoskeletális scaffold protein jellemzése és tumorképződésben játszott szerepének vizsgálata (K 81676)**

A pályázat fő célkitűzése HOFI (Homologue of FISH, Tks4/fad49/SH3PXD2B) adaptor fehérje jellemzése, protein interakcióinak vizsgálata és a tumorok kialakulásában játszott szerepének vizsgálata volt.

A fehérjét három kutatócsoport azonosította egymástól függetlenül. Kutatócsoportunk a p47<sup>phox</sup> fagocita oxidáz komplex komponensének homológ fehérjéit keresve (BLAST analízissel) izolálta a HOFI protein cDNS-ét, specifikus ellenanyagot állított elő majd igazolta a fehérje expresszióját szinte minden letapadó sejtípusban. A Sara Courtneidge által vezetett csoport a FISH/Tks5fehérjével mutatott homológia alapján azonosította a gént és Tks4 (tyrosine kinase substrate with four SH3-domains) nevezte el. A Courtneidge csoport a FISH/Tks5 fehérje vizsgálatakor azt találta, hogy az invadopódiumok és a kialakulásukban alapvető szerepet játszó FISH/Tks5 fehérje jelenléte az emlő-tumorok növekedéséhez in vitro és in vivo is szükséges<sup>1,2</sup> Mivel a FISH/Tks5 a szerkezet és szekvencia alapján a HOFI fehérje legközelebbi homológja, funkcionális átfedés a két protein között, vagy egymás funkcióinak szabályozása (kompetíció által) nagyon valószínű. Valóban, saját csoportunk és Sara Courtneidge kutatócsoportja is kimutatta, hogy a HOFI (Tks4) fehérje megtalálható és eszenciális a podoszómák és invadopódiumok kialakulásához és funkcionális aktivitásának (pl. proteázok szintézisének) biztosításához. Mivel ezek a sejt-képződmények alapvető szerepet játszanak a sejtek in vitro és in vivo mozgásában is, gén-csendesítés módszerével és HOFI KO-egerek sejtjeinek felhasználásával részletesen tanulmányoztuk a HOFI fehérje migrációra gyakorolt hatását.

A FISH/Tks5 protein szerepet játszik továbbá a metasztázisok vaszkularizációjában kialakításában is<sup>2</sup>, így vizsgáltuk a HOFI fehérje és endotél sejt migrációra és endotél sejt-funkciókra gyakorolt hatását, valamint szerepét a tumorok által indukált érképzésben. A HOFI fehérje in vivo funkciója a normál egyedfejlődésben is rendkívül fontos. Két független állatmodellben HOFI hiányában glaukóma, halláskárosodás, csökkent testméret, kóros csontfejlődés és a fehér zsírszövet szinte teljes hiánya figyelhető meg<sup>3,4</sup>. A protein hiánya emberekben a Frank-TerHaar szindróma (MIM249420) kialakulásához vezet<sup>3</sup>.

**A PÁLYÁZAT ÁLTAL TÁMOGATOTT KUTATÁS LEGFONTOSABB EREDMÉNYEI:**

### **I. A HOFI/Tks4 fehérje celluláris lokalizációja, protein interakciói**

Vizsgálatainkban több egymást kiegészítő módszer felhasználásával vizsgáltuk a HOFI protein lokalizációját, interakcióit, és funkcióit. A teljes hosszúságú proteint vagy annak különböző doménjeit expresszáló plazmidok felhasználásával, RNS interferencia HOFI-specifikus ellenanyagok felhasználásával kimutattuk, hogy

- A) a HOFI protein citoplazmatikus, és perinukleáris festődést mutat, de növekedési faktorok hatására a fehérje a keletkező membránfodrokba és lamellipódiumokba helyeződik át. Ezt HOFI-specifikus antitest és fúziós protein overexpresszióval is megerősítettük.
- B) RNS interferencia segítségével (stabil sejtvonalakban és tranziens transzfekcióval is) kimutattuk, hogy a HOFI protein hiányában az EGF-indukált membrán-fodrok és lamellipodiumok száma és mérete erősen csökken.

- C) A HOFI fehérje hiányában a cortactin EGF-indukált membrán-fodrokba és lamellipodiumokba történő transzlokációja elmarad.
- D) A HOFI protein komplexet képez a cortactinnal valamint a Src protein tirozin kinázzal<sup>5</sup>
- E) Buday László kutatócsoportjával kollaborációban kimutattuk, hogy EGF hatására a HOFI fehérje membrán-transzlokációját követően az EGF receptor a Src tirozin kináz és a HOFI egy komplexben található. A komplex létrejötte PI3-kináz és Src-függő folyamat<sup>6</sup>. A PI3-kináz által foszforilált foszfatidil-inozitol-bis-foszfátok és (3,4,5)-trifoszfát kötést létesít a HOFI fehérje PX-doménjével (Phox homology domain)<sup>5,6</sup>.

## II. A HOFI/Tks4 fehérje funkcionális jellemzése

### II.1. A HOFI sejtproliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata.

A HOFI protein magas szintű expressziója különböző tumoros sejtekben gyakori. Az overexpresszió tumorokban utalhat onkogén hatásra, de mutáció által inaktivált tumor szupresszor fehérjék esetében (pl. a p53 fehérje esetében) is megfigyelhető overexpresszió.

A HOFI fehérje daganatsejtekben játszott szerepének vizsgálatára RNS-interferencia segítségével több különböző típusú tumorból származó HOFI-negatív független sejtvonalat hoztunk létre. Az RNS interferenciát a HOFI gén két különböző szekvenciára specifikus shRNS-t expresszáló plazmid stabil transzfekciójával váltottuk ki. A kontrol sejtvonalak négy „pontmutációt” hordozó shRNS-t expresszáltak.

HOFI-hiányos HeLa (humán méhnyak rák) YDFR B3 és A2058 humán melanóma sejtvonalak proliferációjának vizsgálatokor azt találtuk, hogy a HeLa és a YDFR sejtek proliferációja HOFI hiányában fokozódik, viszont az A2058 sejtekben csökken, ami azt jelezheti, hogy a HOFI protein komplex módon képes a sejtproliferáció szabályozására, esetleg több jelátviteli útvonal együttes szabályozásával, amelyek aktivitása különböző lehet. A tumorsejtek eltérő „fejlődéséből” eredő különbségek kiküszöbölésére HOFI-hiányos egerekből származó embrió fibroblaszt sejteken tervezzük a sejtproliferációra gyakorolt hatás analízisét (ezek a kísérletek jelenleg folyamatban vannak).

### II.2. A HOFI fehérje sejtmozgásokra és sejtmigrációra gyakorolt hatásának vizsgálata primer sejtek (pl. HUVEC, csontvelő-eredetű egér makrofágok) és sejtvonalak (HeLa,) felhasználásával.

A sejtek irányított mozgása, migrációja a szövetekben számos normál, és patológiás folyamatnak (például a tumorsejtek metasztázis-képzése) meghatározó eleme, amelynek

molekuláris mechanizmusa nem ismert részleteiben. A HOFI fehérje a migrációban fontos sejtkepződmények (lamellipódiumok, podoszómák) kialakításában játszott szerepe által fontos szabályozó protein lehet.

A HOFI sejt migrációra gyakorolt hatásait az előzőekben leírt HOFI-hiányos sejt vonalak, HOFI-specifikus siRNS tranziens transzfekciójával géncsendesített humán makrofágok valamint Hofi-hiányos egerekből származó csontvelő-eredetű makrofágok vizsgálatával végeztük. A kísérletek Dr. Czirók András és Dr. Méhes Előd (ELTE, Biofizika Tanszék) közreműködésével, time-lapse videomikroszkópia és standard transwell kísérletek felhasználásával történtek.

Legfontosabb megfigyeléseink a következők:

1. A HOFI fehérje hiányában a HUVEC sejtek és a csontvelő-eredetű egér makrofágok kétdimenziós (2D) spontán motilitása fibronektinnel bevont felületen meglepő módon nem csökken, hanem kis mértékben növekszik. A motilitás fokozódik sphingosin 1-phosphate jelenlétében. Ezt a megfigyelésünket videomikroszkópos és transwell kísérletek is igazolták.
2. Hasonló rendszerekben a transzformált sejt vonalak (pl. HeLa sejtek) migrációja HOFI hiányában csökken.
3. Az élettani szempontból relevánsabb három-dimenziós (3D) sejt mozgások vizsgálatakor kimutattuk, hogy 3D Type-I kollagén gélben a HUVEC sejtek és a primer egér makrofágok motilitása is függ a HOFI jelenlététől, HOFI hiányában jelentős mértékben csökken. A HOFI-hiányos HeLa sejtek mozgása 3D kollagén gélben szintén csökken.
4. HOFI fehérje hiányában nemcsak a HUVEC sejtek 3D mozgása csökken, az egymással létesített kapcsolatok száma is kvantitálható módon csökken. Vagyis a fehérje hiányában az endotél sejtek által kialakított 3D hálózat egyszerűbb, ami a HOFI érhálózatok kialakulásában játszott szabályozó funkciójára utal.
5. A HOFI hiányában a HUVEC és az egér makrofág sejtek proteolitikus aktivitása jelentős mértékben csökken. A sejtek fluoreszcens festékkel (FITC) jelölt zselatinnal fedett tárgylemezre helyezve nem vagy csak igen kismértékben képesek a FITC-zselatin emésztésére. Ez magyarázhatja a 3D motilitás csökkenését Type I kollagén gélben.

*Összefoglalva, kimutattuk, hogy a HOFI fehérje primer sejtekben és tumor sejt vonalakban is fontos szabályozója a sejt mozgásnak, és alapvető szerepe van a sejt által termelt proteolitikus enzimek szekréciójának szabályozásában. Ezt a hatását vélhetően az MT-1-MMP (MMP14) membrán típusú metalloproteináz szabályozásán keresztül fejtheti ki. Mivel a HOFI fehérje és az MT1MMP is a podoszómákban és a tumor sejtek invadopódiumaiban lokalizálódik direkt vagy indirekt komplex képzés a két protein között valószínű.*

### **II.3. A HOFI szerepe az endotél funkciók szabályozásában.**

A tumor-progresszió esszenciális lépése a tumor-asszociált érhálózat kialakulása. Eredményeink szerint a HOFI fehérje hiánya jelentősen befolyásolja a humán endotél sejtek

(HUVEC) migrációját és érkepzést in vitro, továbbá a HOFI-homológ FISH (Tks5) fehérjéről Sarah Courtneidge csoportja kimutatta, hogy szükséges egyes tumorok érhálózatának kifejlődéséhez in vivo <sup>2</sup>. Ezért úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk, van a HOFI fehérje hatásait az endotél sejtfunkciók szempontjából fontos jelátviteli útvonalakra. Mivel az sphingosine 1-phosphate (S1P) molekula fontos szabályozója az endotél sejtek migrációjának, az angiogenezisnek és az erek megtartásának, megvizsgáltuk, hogyan változik S1P hatására az egyes fehérjék foszforilációja. HUVEC sejtekben a HOFI expressziót specifikus siRNS transzfekciójával gátoltuk, majd a sejteket S1P-vel aktiváltuk és a sejtizlátumokban protein array-k segítségével mértük a MAP-kinázok, az NF-kB1 és a PI3K/Akt/mTOR/p70S6 útvonal fehérjéinek foszforilációját.

Kimutattuk, hogy az említett fehérjék foszforilációja a HOFI hiányában fokozott mértékű. A p53 fehérje S1P-indukált foszforilációja ugyanakkor HOFI hiányában csökkent. Ezek a megfigyelések teljes összhangban állnak korábbi eredményeinkkel, (Bögel és mtsai) melyek szerint a HOFI fehérje része az EGFR/PI3K/Akt/mTOR jelpályának a és azt jelzik, hogy a HOFI fehérje a jelpályák fontos szabályozója lehet. regulátor szerepét valószínűsítik. Feltételezésünk szerint a sejt általános metabolizmus szabályozásában is részt vehet.

A fenti jelpályák fontos szerepet játszanak az endotél sejtek szaporodásának és/vagy stressztűrő képességének szabályozásában. A pályázat keretében végzett kutatásaink egyik legfontosabb eredménye szerint a HOFI fehérje jelenléte esszenciális a hidrogén peroxid, vagy a gyulladási citokinek (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) által indukált Cox-2 expressziójához. Ez utóbbi megfigyelésünk különösen izgalmas, mivel a tumor-környezetben a Cox-2 expressziója angiogenezist serkentő hatású, és több független tumormodellben is kimutatták, hogy esszenciális a tumorok kifejlődéséhez. A Cox2 expresszió csökkenése, csökkentése a terápia szempontjából fontos lehet.

#### **II.4. A HOFI fehérje tumor progresszióban játszott szerepének vizsgálata.**

A HOFI fehérje tumorprogresszióra gyakorolt in vivo funkcióinak vizsgálatához két független egérmodellt használunk. Az egyik egy természetes KO egértörzs (nee) <sup>4</sup> amelyet a Jackson laboratóriumban írtak le, a másik Buday Lászlóval kollaborációban a Taconic Biosciences, Inc. által kifejlesztett Sh3pxd2b/HOFI kondicionális KO törzs<sup>6</sup>. A két törzs fenotípusát tekintve azonos, bár az Sh3pxd2b kondicionális KO egerek életképessége a születés körüli időszakban jelentősen gyengébb. Az utóbbi egértörzsnek azonban nagy előnye, hogy lehetőség van a HOFI gén szövet-specifikus eliminációjára az 5. és 6. exon környezetében található LoxP helyek segítségével.

A HOFI fehérje tumor növekedésre gyakorolt hatásával kapcsolatban két fontos kérdésre keressük a választ:

- 1) Hogyan befolyásolja a HOFI fehérje a sejtek proliferációját?
- 2) Hogyan befolyásolja a HOFI fehérje a tumor-asszociált sztróma funkcióját?

## **1) A HOFI fehérje tumorsejt proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálata SCID egerekben**

A Debreceni Egyetem állatházában beállítottuk a SCID egerek tenyésztésének feltételeit.

- Kimutattuk, hogy SCID egerekben az A2058 humán melanóma sejtek növekedése HOFI hiányában fokozódik. Az eddigi két kísérlet alapján a tumorok mérete nagyobb és a daganatok hamarabb jelennek meg. A tumorok érhálózatának vizsgálata és a tumorok in vivo proliferációjának analízise (BrdU beépülés mérésével) folyamatban van.
- Mivel az in vitro proliferációs kísérletekben különbség volt a HOFI sejtproliferációra gyakorolt hatását illetően, így szükséges további sejtvonlak (pl a YDFRB3 vonal) vizsgálata SCID egerekben.

## **2) A HOFI fehérje szerepe a Tumor asszociált sztróma funkciókban.**

Az utóbbi évek fontos eredménye a tumor-asszociált sztróma tumorprogresszióban játszott szerepének felismerése<sup>7</sup>. A sztróma legfontosabb funkciója a tumor oxigén- és tápanyagszükségletének (érhálózatának) valamint immunszuppresszív környezetének biztosítása.

A HOFI fehérje tumor-asszociált sztrómára gyakorolt hatását a jól ismert B16 melanóma és a Lewis-Lung Carcinoma (LLC) modellben tanulmányoztuk.

- Vad-típusú és HOFI-hiányos (nee) egerekbe (subcutan) B16 egér melanóma vagy LLC egér tüdő tumor sejteket oltottunk és mértük a tumorok méretét és erezettségét. Két egymástól független kísérletben megfigyeltük, hogy a HOFI-hiányos egerekben a tumorok növekedése jelentős mértékben csökken. Érdekes módon a tumorok érhálózata nem különbözött szembetűnően.

- a tumorok méretének csökkenését okozhatja az immunfunkciók megváltozása a sztrómában, de nem zárható ki az sem, hogy a KO-egerekben a fehér zsírszövet hiánya gátolja a tumorok gyors növekedését.

- Hipotézisünket csontvelő transzfer kísérletekkel vizsgáltuk.

- B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (BoyJ) egerek immunrendszerét sub-letális (11Gy) besugárzást követően vad-típusú vagy HOFI-hiányos állatok csontvelő sejtjeivel rekonstituáltuk. Amennyiben a tumornövekedésben tapasztalható különbség a testtömeg, vagy a zsírszövet mennyiségének különbségére vezethető vissza, a csontvelő transzfert követően a különbség megszűnik (a transzplantált állatok testtömegében és a zsírszövet mennyiségében nem találtunk eltérést). A transzplantált egerekkel végzett kísérleteinkben azonban a tumornövekedésben tapasztalt különbségeket továbbra is ki tudtuk mutatni. A HOFI-hiányos csontvelőt kapott egerekben a tumorok lassabban nőttek, ami a jelenség hematopoetikus hátterére utal. A HOFI T- és B-sejtekben neutrofilekben és monocitákban nem expresszálódik, így feltételezhető, hogy a csökkent tumorméretért a tumor-asszociált makrofágok, és/vagy myeloid szuppresszor sejtek lehetnek felelősek.

-A HOFI tumor-asszociált makrofág funkciókra gyakorolt hatását a tumorba infiltráló sejtek számának és minőségének meghatározásával (áramlási citometria,

immunfluoreszcencia) végezzük. Előzetes eredményeink szerint a HOFI-KO sztrómába injektált B16 sejtekben a beszűrődő M1/M2 makrofágok aránya megváltozik.

- Továbbá létrehoztunk egy szövet-specifikus HOFI-KO transzgenikus egértörzset, amelyben a LoxP szekvenciák által határolt HOFI génszakasz a lizozim promóter által szabályozott CRE-rekombináz által az egerek makrofágjaiban (szelektíven) kimetsződik, ami a HOFI gén makrofág-specifikus inaktivációjához vezet. Ebben az egértörzsben jól vizsgálhatók lesznek a HOFI fehérje makrofág funkciókra gyakorolt hatásai. A modell előnye továbbá az is, hogy a teljes KO-val szemben ezekben az egerekben nem alakulnak ki a nee egerekben megfigyelhető súlyos fejlődési rendellenességek (Lányi és mtsai).

A pályázat által támogatott kutatás legfontosabb eredményeinek összefoglalása:

1. A HOFI fehérje expressziójának intracelluláris lokalizációjának meghatározása
2. A HOFI fehérje protein interakcióinak vizsgálata, 3 új fehérje interakció (EGFR, Src és cortactin) leírása
3. kimutattuk, hogy a primer endotélsejtek, egér makrofágok és tumor sejtvonalak migrációja 3D kollagén gélben HOFI hiányában erősen csökken.
4. A csökkent migrációt az MT1-MMP metalloproteináz HOFI-függő aktivációjának elmaradása okozhatja.
5. HUVEC sejtekben kimutattuk, hogy a HOFI fehérje hiányában fokozódik a PI3K/Akt/mTOR jelpálya aktivitása és a stressz-indukált valamint a gyulladási citokin-indukált COX2 expresszió elmarad, vagy minimális mértékű.
6. A HOFI fehérje szabályozza a tumorsejtek szaporodását, de hatása nem azonos különböző sejtvonalakban.
7. A HOFI fehérje hiányában a B16 melanóma és az LLC egér tumor sejtvonalak in vivo növekedése lassabb, amely a tumor-asszociált sztróma immunsejtjeinek funkcióváltozására vezethető vissza.
8. Létrehoztunk számos HOFI-KO tumor sejtvonalat, transzgenikus és szövet-specifikus HOFI-KO törzseket, melyek segítségével a HOFI protein in vitro és in vivo funkciói vizsgálhatók.

Az adatok felhasználásával további két kézirat megjelenése várható, egy HOFI endotél funkciókra gyakorolt hatásával kapcsolatban, egy másik a HOFI tumor-asszociált sztrómára és a tumorprogresszióra való hatásával kapcsolatban.

Summary of the most important findings:

1. Characterization of the expression pattern and the intracellular localization of the HOFI adaptor protein.
2. Identification of three novel protein interactions of HOFI (EGFR, Src and cortactin)
3. We found that 3D migration in type I collagen gels of primary endothelial cells, macrophages and tumor cell lines is grossly reduced in the absence of HOFI.
4. The activity of MT1-MMP membrane type metalloproteinase is dependent on the presence of HOFI in endothelial cells, which explains the reduction of motility in 3D collagen gels.
5. We found that in HUVECs S1P-induced activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway is increased in the absence of HOFI. In addition, we showed that cytokine- or oxidative stress-induced activation of COX-2 expression in HUVECs is dependent on the presence of HOFI.
6. The effect of HOFI on proliferation of human cancer cell lines is quite variable, suggesting that HOFI is part of a complex network regulating cell-proliferation.
7. In HOFI-deficient mice the growth of the growth of the B16 murine melanoma and the LLC murine lung tumors is slower due to altered development of the tumor-associated stroma. Our by bone-marrow transfer experiments suggest that, altered immune cell functions are responsible for the slower growth of the tumors.
8. During this grant period we established multiple HOFI-negative cell lines, transgenic and a transgenic strain, in which HOFI expression is only defective in macrophages (macrophage-specific KO). These cell lines and genetic models will be useful for further functional studies.

- 1 Blouw, B. *et al.* The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* **10**, e0121003, doi:10.1371/journal.pone.0121003 (2015).
- 2 Blouw, B., Seals, D. F., Pass, I., Diaz, B. & Courtneidge, S. A. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *Eur J Cell Biol* **87**, 555-567 (2008).
- 3 Iqbal, Z. *et al.* Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *Am J Hum Genet* **86**, 254-261 (2010).
- 4 Mao, M. *et al.* The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development. *Mamm Genome* **20**, 462-475 (2009).
- 5 Lanyi, A. *et al.* The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading. *PLoS One* **6**, e23653.
- 6 Bogel, G. *et al.* Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration. *J Biol Chem* **287**, 31321-31329.
- 7 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.