

Összegző tézisek

**Pirity Melinda
1997**

1.

Az egyetemi doktori értekezés rövid áttekintése

(A hsp68 szerepe a hőtoleranciában)

A stresszhatások elleni védekezés univerzális módja az ún. stresszválasz, mely a stresszgénekről átiródó stresszfehérjék (általánosabban hősokkproteinek) erőteljes, gyors, átmeneti szintézisével jár együtt (1).

A hősokkfehérjék (hsp-ek) hozzásegítik a sejteket a stressz károsító hatásainak kivédéséhez és a stresszkörülményekhez való alkalmazkodáshoz.

A stresszhatások okozta sérülések kivédhetők vagy csökkenthetők, ha a sejteket előzetesen pl. egy enyhébb hőkezelésben részesítjük. Ekkor ugyanis kialakul a hőtűrés képessége (termotolerancia), mely maximum néhány napig tart (termotoleráns periódus) (2). A termotoleráns sejt nemcsak a letális hőstresszel, hanem egyéb (kémiai stresszorok, UV vagy röntgen sugárzás) kezelésekkel szemben is ellenállóbb mint a nem toleráns (3).

Az egyedi hsp-ek szerepének jelentősége a termotolerancia kialakulásában fajonként ill. szövetenként specifikusan változik és jelenleg is intenzív kutatások tárgyát képezi.. Az egyedi hősokkproteinek szerepének pontosabb megismerésében az in vitro fenntartható stresszválaszadási képességben deficiens sejtvonalak - melyekből csak kevés létezik - nagy segítséget jelentenek.



Eredmények összefoglalása

Doktori disszertációm tárgyát a hsp68 indukcióban deficiens patkány hepatóma variáns(ok) stresszválaszának jellemzése és "alkalmazhatóságának bemutatása" képezte. Hsp68 indukcióban deficiens sejtvonalak alkalmazásával módunkban állt a hsp70 családhoz tartozó hőindukálható hsp68 hőtüreklépesség (termotolerancia) kialakulásában játszott szerepének tanulmányozására.

Kísérleteink azt a nézetet támasztottak alá mely szerint a hsp68 kitüntetett szerepet játszik patkány hepatóma variánsaink termotoleranciájának kialakulásában.

Sikerült egy olyan kísérleti rendszert létrehozunk, melyben a termotolerancia és a hsp68 kapcsolatát tudtuk vizsgálni. Erre a lehetőséget a hsp68 indukcióban sejt (klón 2) ill. stresszorspecifikusan (H56) deficiens patkány hepatóma variánsok teremtték meg. A csökkent hsp68 indukciót mutató sejtek deficienciájának mértéke különbözött egymástól, ami lehetővé tette a termotolerancia kiváltásához szükséges hsp68 mennyiségének becslését is.

A deficiencia lehetséges okait vizsgálva megállapítottuk, hogy az nem a hsp szintézis megváltozott kinetikájának eredménye és nem függ össze a többi fő hsp indukciójának megváltozásával. A deficiens sejtek fő hősokkproteinjeinek indukciója a Faza 968 sejtéhez hasonlóan intenzív marad.

Termotoleranciát tudtunk kiváltani az intenzív hsp68 indukciót mutató sejtekben hővel és kémiai stresszorok alkalmazásával egyaránt. Mivel a hőnek és a nátrium arzenitnek feltehetően mások a sejtekben a célpontjai, ez azt jelenti, hogy sejteink többféle mechanizmuson keresztül is képesek termotoleranciát kifejleszteni. Az alkalmazott stresszor természetétől függetlenül (hő, nátrium arzenit) mindegyik esetben fontos szerepe volt a hsp68-nak hiszen a termotolerancia kialakulása korrelált a hsp68 indukciójával, sőt annak indukciós szintjével.

Rendszerünkben az általunk vizsgált hsp-ek közt csak a hsp68 szintjében volt különbség, ezért úgy gondoljuk sejtvonalainknál ez a protein a termotolerancia megjelenésében meghatározó szerepet játszik. Funkcióját sem a konstitutív és egyben hőindukálható hsp70 sem a többi hsp nem tudta átvenni.

A sejtekben a differenciációs állapottól és a glukokortikoid érzékenységtől függetlenül jelent meg a termotolerancia, amiből arra következtetünk, hogy ezen tulajdonságok nem játszanak jelentős szerepet a hőtűrőképesség megszerzésében.

Irodalomjegyzék

1. Lindquist, S., Craig, E.A. Ann. Rev. Genet. 22, 631-77 (1988)
2. Gerner, E.W., Schneider, M.J. Nature 256, 500-02 (1975)
3. Morimoto, R. I., Tissieres, A., Georgopoulus, C. Hyperthermia in cancer therapy-Model systems: An overview. In Stress proteins in biology and medicines. CSH press, Cold Spring Harbor, New York. 287-99 (1990)

Az értekezés témakörébe tartozó közlemények jegyzéke

PIRITY M., NGUYEN VAN TRUNG, DUBOIS M. F., BENSAUDE O., HEVÉR-SZABÓ A., VENETIANER A. Decreased stress inducibility of the hsp 68 protein in a rat hepatoma variant clone. 1992. Eur. J. Biochem. 210: 793-800.

VENETIANER A., PIRITY M. and HEVÉR-SZABÓ A. The function of heat-shock proteins in stress tolerance. 1994. Cell Biol. Internat. 18/6: 605-615

PIRITY M., HEVÉR-SZABÓ A., VENETIANER A. Overexpression of P-glycoprotein in heat- and/or drug-resistant hepatoma variants. 1996. Cytotechnology. 19: 207-214

Az alábbi témakör szorosan kapcsolódik doktori disszertációm tárgyköréhez. Az itt összefoglalt anyag az 1994 évben sikerrel megpályázott OTKA pályázatomban célkitűzéseit és lényegi kivonatát tartalmazza.

2.

Multidrog rezisztencia (MDR) indukálása és vizsgálata patkány hepatóma sejtvonalakban

Elsőként a daganatos sejtek elpusztítását célzó kemoterápiás kezeléseknél figyelték meg, hogy bizonyos tumortípusokban rezisztencia fejlődött ki egy sor strukturálisan és funkcionálisan eltérő vegyülettel szemben. Ez a jelenség a multidrog rezisztencia (MDR), mely sokszor a multidrog rezisztenciát okozó glikoproteint (Pgp vagy P170) kódoló MDR gének aktivációjával jár együtt (1). A Pgp 1280 aminosavból álló többnyire 170 KDa molekulatömegű molekula, mely a sejtek membránjába ágyazódva tandem duplikált struktúrát alkot: a két homológ, egyenként hat transzmembrán és egy nukleotidkötő (Walker motívum) doménből álló molekulafelet egy kapocsrégió köti össze (2). Szerkezete alapján nagyfokú hasonlóságot mutat több bakteriális és eukarióta transzportfehérjével (3), így pl a cisztikus fibrozis transzmembrán regulátor fehérjével (CFTR)(4). Jellegzetes ATP kötő régiója és domén organizációja alapján tagja az ABC (ATP Binding Casette) transzporter fehérjecsaládnak (5).

A multidrog rezisztens fenotípus megjelenése igen gyakran a Pgp aktív drog eltávolító tevékenységének a következménye. ATP hidrolízis segítségével a sejtekből kifelé pumpálva meggátolja a drogok sejten belüli felhalmozódását (6). A multidrogtranszporter Pgp pontos működési mechanizmusa nem ismert. Számos esetben kimutatták, hogy az aktív Pgp foszforilált. A foszforilációt a humán karcinoma sejtekben a protein kináz C (7), míg a humán

leukémia sejtekben egy új típusú membránkapcsolt protein kináz végzi (8). Legutóbb a humán karcinoma sejtek Pgp foszforilációs helyeinek azonosításáról is beszámoltak (9). Működését újabban összefüggésbe hozzák a térfogat regulált, ATP függő klorid csatornákkal (10).

A Pgp kémiai szempontból a drogok igen széles skálájával képes kölcsönhatásba lépni: különböző rákellenes szerekkel mint pl aktinomicin D, doxorubicin, etopozid (VP-16), tenipozid (VM-26), vinblasztin, vinkrisztin ill. egyéb drogok (kolhicin, puromicin, etidium-bromid). A pumpa drogszelektivitását a transzmembrán régió szerkezetében bekövetkezett változás, pl. Gly-185 - Val-185 pontmutáció megváltoztathatja (11). A drogfelvétel telíthető, sőt az egyes drogok egymást kompetitív módon kiszoríthatják (12). Ebből kindulva a klinikumban antagonistákkal (verapamil, ciklosporin A) terhelik le az efflux pumpát, aminek következtében már nem lesz képes a citosztatikumok kipumpálására (13-14). Sejttenyészetekben a multidrog rezisztens fenotípus megnyilvánulása egyéb módszerekkel is visszaszorítható: pl. ribozimos hasítással inaktiválhatóak a Pgp mRNS-ek (15) vagy liposzómákba burkolt antiszensz oligonukleotidokkal gátolható meg a Pgp fehérjék képződése (16-17).

Nem minden multidrog rezisztens sejtvonal rendelkezik azonban a Pgp drog efflux pumpával. A nem Pgp közvetített multidrog rezisztens fenotípus kialakulása számos esetben összefügg néhány enzim megváltozott aktivitásával. Megfigyelték például az oxidatív stresszfolyamatokból jól ismert glutation-S-transzferáz (GST) enzim aktivitás növekedését ill. a xenobiotikus anyagcserefolyamatok citokróm P450 enzimjeinek aktivitás csökkenését (18). Legjobban tanulmányozottak a DNS topoizomeráz II (topo II) enzim mennyiségi és minőségi megváltozásával kapcsolatos folyamatok. A topo II a nukleáris mátrixban, több genetikailag különböző izoforma (p170 vagy II α ill. p180 vagy II β) alakjában fordul elő, melyek mind biokémiaiilag, mind drogérzékenységükben eltérnek egymástól (19-20). A topo II láncszétkapcsoló és újraegyesítő tevékenysége folytán képes a DNS mindkét szálán topológiai változásokat létrehozni. Közreműködése elengedhetetlen a replikációs villa előrehaladásához, így a DNS megkettőződéséhez. Drog szenzitív sejtekben bizonyos interkalatív antitumor drogok (aktinomicin D, m-AMSA), ill. a nem interkalatív epipodofillotoxinok (VP-16, VM-26) a

topo II működését a láncszétkapcsoló lépésben blokkolják olyan módon, hogy stabilizálják a törött szálvégekből majd hozzájuk kovalenssen bekötődő topo II enzimekből álló komplexek képződését ("cleavable" komplex). Ennek az lesz a következménye, hogy a topo II nem lesz képes leválni a DNS-ről és így nem valósulhat meg a szálújraegyesítő (ligálás) lépés (21-22). Drogrezisztens sejtekben a topo II mennyiségének vagy drogkötő képességének megváltozása folytán nem, vagy csak kevés számú "cleavable" komplex jön létre. (23).

Néhány esetben sem a Pgp efflux pumpával, sem a topo II különböző változataival nem hozható összefüggésbe a multidrog rezisztencia megjelenése. Előfordul, hogy módosul a multidrog rezisztens sejtek fehérje vagy sejtmembrán lipid összetétele (24). Multidrog rezisztens sejtvonalakban a membránfluiditásnak mind csökkenéséről, mind növekedéséről beszámoltak (25). Multidrog rezisztens humán leukémia sejtekben észlelték egy Pgp-al nem analóg, p150 elnevezésű membránalkotó fehérje foszforilációs állapotváltozását is (26). "Fagyasztva-töréses" eljárással multidrogrezisztens sejtekben kimutatták az intramembrán partikulumok számának és nagyságának megváltozását (27).

A multidrog rezisztencia kialakulásának komplex jellegére utal, hogy legtöbbször a fenti változások közül több együttesen vezet a multidrog rezisztencia megjelenéséhez.

A multidrog rezisztencia gén konstitutív expresszióját figyelték meg funkciójuknál fogva toxikus stressznek kitett szövetekben (máj, bél, vese)(28-29). Renális karcinóma sejtekben a hőstressz és a nátrium-arzenit (NaAs) kezelés a multidrogtranszporter Pgp mRNS-ek mennyiségének növekedését váltotta ki. A növekedés a multidrogtranszporter fehérje mennyiségében is megmutatkozott és a sejtek vinblasztinnal szembeni átmeneti rezisztencia növekedéséhez vezetett (30). Humán hepatokarcinóma sejtekben NaAs-el szintén Pgp mRNS akkumuláció növekedést sikerült kiváltani (31). Mindezek arra engedtek következtetni, hogy a környezeti stressz képes a multidrog rezisztencia gén expresszióját szabályozni (32-34).

A multidrog rezisztencia gén stressz indukálta transzkripciós aktivitásáért a promotor régióban elhelyezkedő hősokk konszenzus elemek (HSE) felelősek. Ez megerősítette azt a feltételezést, hogy a multidrog rezisztencia gén egy stresszgén (35). Stresszhatásra a

stresszgének indukciója a hősokk-elemekhez specifikusan kötődő hősokk-faktor aktivációján keresztül valósul meg (36). A közelmúltban jelent meg egy hepatokarcinóma sejtekkel kapcsolatos tanulmány, mely leírja, hogy quercetinnel a multidrogrezisztencia gének transzkripciója gátolható (37). A quercetin a HSF-hoz kötődve megakadályozza a stresszgének expressziójához elengedhetetlen HSF aktivációt.

Korábbi munkacsoportom az általunk izolált, differenciációs állapotban, tumorképzés tekintetében és hormonérzékenységben eltérő patkány hepatóma sejtvonalak molekuláris szintű stresszválaszával foglalkozik. Vizsgálataink középpontjában a hősokkfehérjék hőmérséklet emelkedéssel szembeni túlélésben játszott szerepe áll. Mivel a hővel szembeni ellenállóképesség tanulmányozására csak kevés megfelelően jellemzett hőrezisztens sejtvonal állt rendelkezésre, sorozatos hőkezelésekkel stabil, hőrezisztens patkány hepatóma sejtvonalakat állítottunk elő. A variáns sejtek egymástól mind hő mind különböző drogokkal szembeni érzékenység tekintetében eltértek. Izoláltunk néhány olyan sejtvonalat, amelyek ismert rákellenes szerekkel szemben különböző mértékű rezisztenciát mutattak.

Feltételezésünk szerint bizonyos hőrezisztens sejtvonalaink drogokkal szembeni csökkent érzékenysége a multidrog rezisztencia transzporter fehérjét kódoló multidrog rezisztencia gének aktivitásváltozásával magyarázható. Úgy gondoljuk, hogy a hőrezisztens sejtek előállításakor alkalmazott sorozatos hőkezelések a multidrog rezisztencia gén működését is kiváltották. Elgondolásunk alapjául a multidrog rezisztencia génműködés hőstressz általi indukálhatósága képezi, amit a multidrogrezisztencia gének promoter régiójában található hősokk elemek tesznek lehetővé.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a szülői hőérzékeny sejtekhez képest megnőtt a hőrezisztens sejtek drogrezisztenciája is.

Mind a hőérzékeny szülői sejtvonalakból /klón 2/ mind a hőrezisztens származékokból /klón 2 (10x80), klón 2 (10x80)T1/, különböző drogokkal /kolhicin, doxorubicin, puromicin/ több drogrezisztens sejtvonalat izoláltunk. Izolálási eljárásunk alapját az képezte, hogy a

sejteket folyamatosan egyre növekvő drogkoncentrációjú tápoldatban tenyésztettük. Hosszabb idő elteltével (3-6 hónap) a sejtek drogrezisztenciájának kialakulását, drogstresszt követően a sejtek kolóniaképző képessége alapján ellenőriztük. Ugyanezzel a módszerrel több hónapos nem szelektív körülmények között való fenntartás után megvizsgáltuk a drogrezisztens variánsok drogrezisztenciájának stabilitását is. Eredményeink szerint a sejtek drogrezisztenciája stabil és a nem szelektív körülmények közt való fenntartást követően sem csökken.

A legrezisztensebb sejtvonalakból klónokat izoláltunk /pl. klón 2(10x80)T1kol1000kl1-2-3, klón 2kol2000kl2-3/ melyek felhasználásával az elkövetkezőkben a multidrog rezisztencia kialakulásának lehetséges okait kívánjuk vizsgálni.

Northern analízissel össze kivanjuk hasonlítani a drogrezisztens és a szülői drogszenzitív sejtvonalak multidrog rezisztencia génexpressziójánát. Specifikus cDNS próbákkal, a fenti technika felhasználásával össze szeretnénk hasonlítani a drogrezisztens és szülői sejtek multidrog rezisztencia génjének alapszintjét és stresszindukálhatóságát (hőstressz, NaAs kezelés, különböző drogokra adott stresszválasz). Amennyiben a multidrog rezisztencia mRNS szintben különbséget találunk a szülői és drogrezisztens sejtek közt, vizsgálatainkat kiterjesztenénk a Pgp kimutatására is. A sejtek fehérje analízisét mind stressz mind stresszmentes körülmények között radioaktív metioninnel történő jelölést követő egy és két-dimenziós poliakrilamid gélelektóforézis segítségével végeznénk. Szükség esetén a Pgp azonosítását specifikus ellenanyag segítségével tennénk meg. A fehérjeszintű vizsgálatok egyben rávilágítanak a drogérzékeny és drogrezisztens sejtek egyéb fehérjéinek konstitutív szintjében ill. stressz indukálhatóságában bekövetkezett változásokra is. A szülői és drogrezisztens sejtek membránlipid összetételének analízisével a membránfluiditásban bekövetkezett változásokat vizsgálnánk (SZBK Biokémia Intézettel együttműködve). Azt, hogy a drogrezisztencia a sejtek csökkent drogakkumulációjával, vagy egyéb (pl. detoxifikációs, citoplazmatikus fehérjékhez kötött vagy topo II változással kapcsolatos) mechanizmusokkal áll-e összefüggésben, radioaktívan jelölt drogokkal (vinblasztin) való inkubáció után, a beépült radioaktivitás mérésével vizsgálnánk. A drogszenzitív és drogrezisztens sejtekből szomatikus

sejthibrideket hoznánk létre annak érdekében, hogy eldönthessük recesszív, vagy domináns tulajdonság-e a multidrog rezisztencia. A szomatikus sejthibridek drogérzékenységét hasonlóan a szülői sejtekéhez a különböző drogok jelenlétében mutatott kolóniaképzés nyomonkövetésével vizsgálánk. A szomatikus sejthibridek multidrog rezisztencia génexpresszióját Northern-analízissel ill. fehérje gélelektroforézissel néznénk. Irodalomból ismert, hogy a multidrog rezisztencia megjelenése egybeeshet bizonyos kromoszóma modifikációkkal ezért tervezzük a szenzitív és drogrezisztens sejtvonalak kromoszóma készletének összehasonlítását (kromoszómapreparálás, Giemsa festés). Tesztelni kívánjuk, hogy a kialakult multidrog rezisztencia befolyásolja-e e sejtek bizonyos májspecifikus funkcióinak a kifejeződését (tirozin-amino-transzferáz, alfa-fetoprotein, albumin termelő képesség). Fenti vizsgálataink eredményeitől függően többféle úton léphetnénk tovább: Amennyiben multidrogrezisztens sejtvonalaink rezisztenciája korrelációt mutat a multidrogtranszporter Pgp jelenlétével, úgy tervezzük a Pgp közvetítette multidrogrezisztencia kialakulásához vezető molekuláris folyamatok kutatását (pl. a Pgp esetleges foszforilációs aktivitásváltozásainak kimutatását ill. a drogrezisztens fenotípus reverzióját célzó kísérletek). Ha a sejtvonalainknál észlelt multidrog rezisztencia nem magyarázható sem megnövekedett multidrog rezisztencia génexpresszióval sem pedig egyéb általunk vizsgált jelenséggel, akkor vizsgálataink súlypontját a topo II enzimmel kapcsolatos kísérletekre helyeznénk át (a szenzitív és drogrezisztens sejtek nukleáris topo II tartalmának, a p170, p180 izoformák egymáshoz viszonyított mennyiségének meghatározása).

A klinikumban a daganatok elpusztítását célzó kemoterápiás és hipertermiás beavatkozások a tumorokban gyakran kifejlődő keresztrezisztencia (multidrog és hôrezisztencia) miatt hiúsulnak meg. Úgy gondoljuk az általunk izolált glukokortikoid, hô és drogrezisztens ill. ezen fenotípusok különböző variációit reprezentáló közeli rokon patkány hepatóma klónok egyedülálló lehetőséget biztosítanak a daganatos sejtekben gyakran kifejlődő keresztrezisztencia molekuláris folyamatainak pontosabb megismeréséhez. Eredményeink hozzájárulhatnak a hôvel ill. gyógyszerekkel történő kezelések hatékonyságának növeléséhez.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Endicott, J.A.; Ling, V. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58:137-171
2. Gottesman, M.M.; Pastan, I. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12163-12166
3. Gros, P.; Croop, J.; Housman, D. (1986) *Cell* 47:371-380
4. Hyde, S.C.; Emsley, P.; Hartshorn, M.J.; Mimmack, M.M.; Gileadi, U.; Pearce, S.R.; Gallagher, M.P.; Gill, D.R.; Hubbard, R.E.; Higgins, C.F. (1990) *Nature* 346:362-365
5. Doige, C.A.; Yu, X.; Sharom, F.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1109:149-160
6. Skovsgaard, T. (1987) *Cancer Res.* 38:4722-4727
7. Chambers, T.C.; McAvoy, E.M.; Jacobs, J.W.; Eilon, G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:7679-7686
8. Staats, J.; Marquardt, D.; Center, M.S. (1990) *Journal of Biol. Chem.* 265:4084-4090
9. Chambers, T.C.; Pohl, J.; Raynor, L.R.; Kuo, J.F. (1993) *Journal of Biol. Chem.* 268:4592-4595
10. Valverde, M.A.; Diaz, M.; Sepulveda, F.V.; Gill, D.R.; Hyde, S.C.; Higgins, C.F. (1992) *Nature* 355:830-833
11. Safa, A.R.; Stern, R.K.; Choi, K.; Agresti, M.; Tamai, I.; Mehta, N.D.; Roninson, I.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7225-7229
12. Doige, C.A.; Sharom, F.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1109:161-171
13. Thierry, A.R.; Dritschilo, A.; Rahman, A. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1098-1105
14. Warren, L.; Jardillier, J.; Malarska, A.; Akeli, M. (1992) *Cancer Res.* 52:3241-3245
15. Kobayashi, H.; Dorai, T.; Holland, J.F.; Ohnuma, T. (1993) *FEBS Lett.* 319:71-74
16. Thierry, A.R.; Dritschilo, A.; Rahman, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:952-960
17. Thierry, A.R.; Dritschilo, A. (1992) *Nucleic Acids. Res.* 20:5691-5698

18. Satoh,K.; Kitahara,A.; Soma,Y.; Inaba,Y.; Hatayama,I.; Sato,K. (1985) *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3964-3968
19. Austin,C.A.; Sng,J.; Patel,S.; Fisher,L.M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1172:283-291
20. Drake,F.H.; Hofmann,G.A.; Bartus,H.F.; Mattern,M.R.; Crooke,S.T.; Mirabelli,C.K. (1989) *Biochemistry* 28:8154-8160
21. Liu,L.F. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58:351-375
22. Nelson,E.M.; Tewey,K.M.; Liu,L.F. (1984) *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1361-1365
23. Sullivan,D.M.; Eskildsen,L.A.; Groom,K.R.; Webb,C.D.; Latham,M.D.; Martin,A.W.; Wellhausen,S.R.; Kroeger,P.E.; Rowe,T.C. (1993) *Mol. Pharmacol.* 43:207-216
24. Shen,D.; Cardelli,C.; Hwang,J.; Cornwell,M.; Richert,N.; Ishii,S.; Pastan,I.; Gottesman,M.M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:7762-7770
25. Callaghan,R.; Stafford,A.; Epand,R.M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1175:277-282
26. McGrath,T.; Center,M.S. (1988) *Cancer Res.* 48:3959-3963
27. Arsenault,A.L.; Ling,V.; Kartner,N. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 938:315-321
28. Thiebaut,F.; Tsuruo,T.; Hamada,H.; Gottesman,M.M.; Willingham,M.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7735-38
29. Ferguson,L.R.; Baguley,B.C. (1993) *Mutation Res.* 285:79-90
30. Chin,K.; Tanaka,S.; Darlington,G.; Pastan,I.; Gottesman,M.M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:221-226
31. Kioka,N.; Yamano,Y.; Komano,T.; Ueda,K. (1992) *FEBS Lett.* 301:37-40
32. Thorgerisson,S.S.; Huber,B.E.; Sorell,S.; Fojo,A.; Pastan,I.; Gottesman,M.M. (1987) *Science* 236:1120-1121
33. Burt,R.K.; Thorgerisson,S.S. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1383-1386
34. Fardel,O.; Ratanasavanh,D.; Loyer,P.; Ketterer,B.; Guillouzo,A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205:847-852
35. Bienz,M.; Pelham,H.R.B. (1987) *Adv. Genet.* 24:31-72
36. Morimoto,R.I.; Sarge,K.D.; Abravaya,K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:21987-21990



37. Kioka,N.; Hosokawa,N.; Komano,T.; Hirayoshi,K.; Nagata,K.; Ueda,K. (1992) FEBS
Lett. 301:307-309

3.

Jelenleg végzett munkám rövid áttekintése

Analysing the *in vivo* redundancy of members of a gene family: An ES cell mediated genetic approach combining homologous and site specific recombinations

A knowledge of the molecular mechanisms underlying cell fate determination is central to our understanding of embryonic development. An increasing number of molecules involved in developmental switches are being identified and it is becoming apparent that many of these factors are evolutionarily conserved, members of gene families. The strong homologies and co-localisation of expression between gene family members has suggested functional overlap. *In vitro* studies have often confirmed that different members of the same family have related biological properties. Further support for the idea comes from *in vivo* experiments; these include the use of gene targeting to produce null mutants not displaying a predicted phenotype. It therefore appears as though proteins expressed in the same cells can wholly or in part substitute for the function of a mutant or inactive gene of the same family.

The *c-myc* protooncogene is a member of a family of highly related genes (which includes L- and N-*myc*), that have a characteristic 3 exon genomic structure. Exons 2 and 3 contain the coding sequence (see Figure 1). Myc proteins have been shown to act as transcription factors that bind as dimers to target DNA. Their actions are mediated by three N-terminal transactivation domains (Boxes1-3) and a C-terminally positioned basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLHLZ) that acts as a dimerisation domain.

A role for Myc in cell proliferation has been known for some time (Keath *et al.*, 1984), though recent data also suggest that under certain conditions, Myc can also induce cell death (Evan *et al.*, 1992). *In vitro* studies have provided a substantial amount of information about Myc and the Myc switch which involves protein complex formation with several other bHLHLZ families including Max {Myn in mice} (Kato *et al.*, 1992; Prendergast *et al.*, 1991), Mad (Ayer *et al.*, 1993) and Mxi-1 (Zervos *et al.*, 1993).

It has been suggested that after initiation of the cell cycle, Myc acts as a 'life or death' cell fate decision maker. The ultimate decision depends on environmental conditions (Evan and Littlewood, 1993; Amati and Land, 1994). The Max protein can homodimerise, but prefers to heterodimerise with Myc (which cannot homodimerise). Mad and Mxi-1, like Myc, are unable to homodimerise, but form heterodimers with the common partner Max. Since Mad and Mxi-1 lack transactivation domains, Mad/Max and Mxi-1/Max dimers act as antagonists of Myc/Max. In this manner, the relative abundance of Max partners determines the most common pairing at any given time. Interestingly, both the transcripts and the proteins of Myc, Mad and Mxi-1 have short half lives and are tightly regulated during development (Larsson *et al.*, 1994) which suggests a dynamic finely tuned relationship.

Preliminary work in the receiving lab.

To date five members of the myc family have been identified; N-, c- L- B- and s-myc . B- and s-myc, which have been cloned in the rat, are only expressed in a very limited population of cells. Mice homozygous for the targeted disruption of L-myc are viable (R.LePinho, personal communication to A.Nagy). The N- and c-myc knockouts, however, result in midgestation lethality (Sawai *et al.*, 1991; Charron *et al.*, 1992; Stanton *et al.*, 1992). These experiments demonstrate a crucial role for c- and N-Myc during normal embryonic development. The rest of this proposal will focus on these two genes.

Both c- and N-myc are expressed very early after implantation in domains which extensively overlap. By 6.5 days post coitum (dpc), transcripts are found throughout the embryo. As development proceeds, the expression of the two genes becomes more spatially restricted and divergent. For example, N-myc is expressed in the the presomitic mesoderm and neural tube and subsequently in tissues derived from migratory neural crest cells. It is abruptly downregulated in most tissues at midgestation, except for a subset of cells in the brain, lung, kidney and intestine. Interestingly, during genesis of these tissues, expression of c-, and N-myc is strikingly complementary, with N-myc often in the epithelial and c-myc in the mesenchymal component. Generally, c-myc is expressed in actively proliferating cells and down regulated in terminally differentiated cells, while N-myc persists through cytodifferentiation (for a complete description see Mugrauer *et al.*, 1988; Hirning *et al.*, 1991; Stanton and Parada, 1992). Additional information on a later developmental role for N-Myc was provided by a 'leaky' mutation (9a) derived in the Rossant laboratory (Moens *et al.*, 1992), in which the neo^r gene is inserted into intron1.

If c- and N-myc have independent biological functions, one might expect embryonic lethality of either knock-out prior to midgestation. By contrast, if the proteins have a similar function, the overlapping expression patterns during early development might allow survival up to the point at which gene expression diverges. Further evidence for this complementarity in Myc function was provided when a heart specific c-myc transgene rescued the heart defect

associated with N-myc 9a/null compound heterozygote. Although these embryos survived to term, they died from failure of proper lung development (Moens *et al.*, in preparation).

A better understanding of the functional relationship between individual members of a gene family and the proteins with which they interact can now be more readily addressed by *in vivo* genetic strategies. Introduction of interchange of coding sequence between different genes and the targeting of specialised mutations, not solely null mutations, can now be used to dissect the functions of different gene family members. To date, three methods for introducing desired changes into the gene of interest have been demonstrated, namely Hit & Run (Hasty *et al.*, 1991), Tag & Exchange (Askew *et al.*, 1993), and a combination of homologous and Cre/loxP site specific recombinations (Gu *et al.*, 1993; Nagy *et al.*, in preparation).

Over the last two years, the Rossant/Nagy laboratories, amongst others, have developed the Cre/LoxP site specific recombinase technology, making it possible to incorporate desired changes into any genomic location of interest.

Nagy *et al.* (1995) have used this technology to introduce a point mutation into N-myc locus, in which the first leucine of the leucine zipper was mutated to a proline residue. The scheme used for the creation of this mutation is detailed in Figure 1. Four genotypes were generated as a result of this experiment (Pneo, Lneo, Plox and Llox), each exhibiting a distinct degree of severity when homozygote, heterozygote or compound heterozygote. Pneo and Plox homozygotes exhibit the same phenotype as the null allele, resulting in death at 11.5 dpc, while heterozygotes on a 129/sv background have a kinky tail. Lneo is a homozygous viable displaying a kinky tail, but when placed over either of the point mutation alleles (Lneo/Pneo or Lneo/Plox), is lethal. As mentioned previously, homozygosity of the 9a allele results in perinatal lethality, but the 9a/Plox compound heterozygote results in embryonic lethality at 12.5 dpc.

Figure 1:
Introducing a point mutation into the N-myc gene using a combination of homologous & site specific recombination.

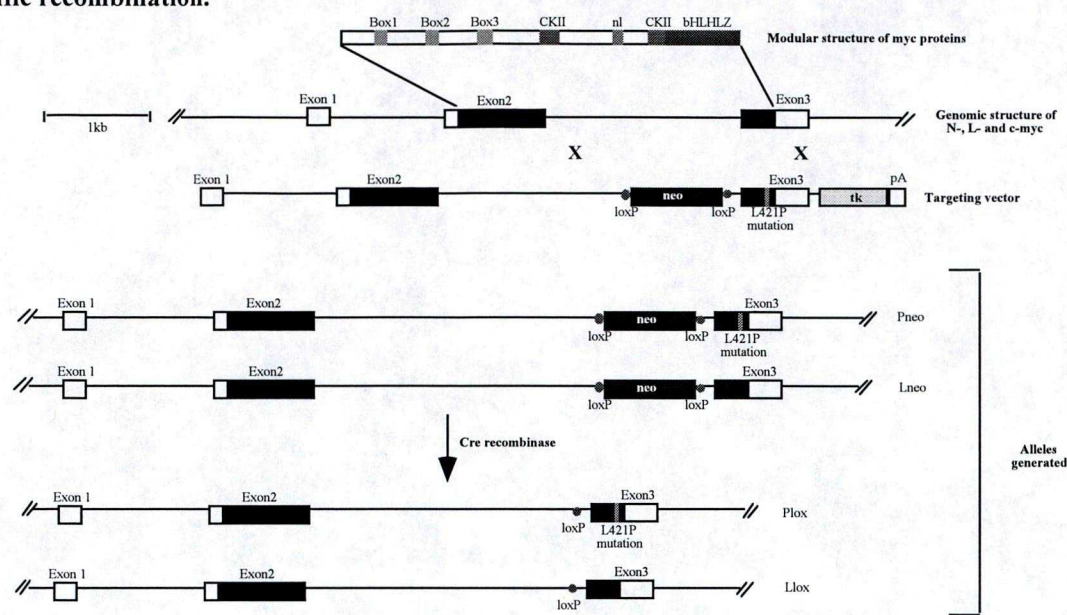
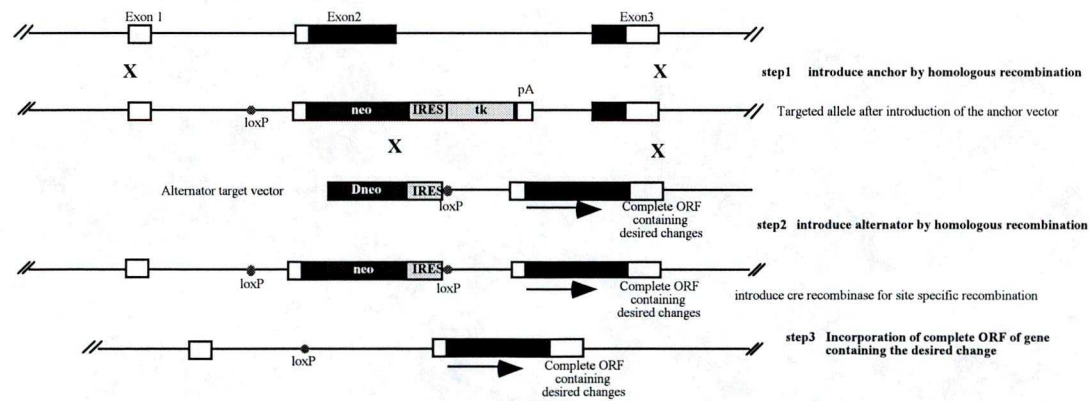


Figure 2:
The anchor - alternator strategy for introducing desired changes into the germline.



Aims of the project.

The studies already outlined have been pivotal in demonstrating the feasibility of combining homologous and site-specific recombinase mediated gene targeting for the

during these initial experiments to extensively analyse the functions of the N- and c-myc genes. There will be three key aspects to the work.

A, Is N-Myc involved in the control of the 'life or death' decision?

In vitro studies have suggested dual roles for Myc in promoting cellular proliferation and apoptosis (Evan and Littlewood, 1993). The hypothesis that N-Myc controls the 'life or death' decision *in vivo* will be tested by creating chimeric mice with N-myc $-/-$ cells.

Since the homozygous null mutant embryos die at the early stages of organogenesis (11.5dpc) it has not been possible to ascertain these putative roles played by the N-Myc protein in more advanced embryos.

As N-myc $-/-$ ES cells can develop beyond 11.5 dpc in chimeras aggregated with normal embryos, N-myc $(-/-)$ $\leftrightarrow$ $+/+$ chimeras will be generated to investigate whether the $-/-$ cells are rescued. Will the mutant cells compete with the $+/+$ cells for contribution to different tissues, such that the $-/-$ cells contribute less to lineages in which Myc has a role in proliferation?

For this study the N-myc $(-/-)$ ES cells will be phenotypically marked; this will be accomplished by breeding the Pneo mice to Rosa 26 homozygotes, which ubiquitously express lacZ (Freidrich and Soriano, 1991), thereby providing a convenient marker for chimeric tissue examination.

B, Can c-Myc fully complement the function of N-Myc?

A strategy has been designed for the introduction of desired changes into a genomic region of interest in ES cells. It relies on the initial experiments of Nagy *et al.* investigating the efficiency of site specific recombinations using the Cre/LoxP system, and will enable us to perform experiments that previously could only be accomplished *in vitro*: introducing changes in the N-myc locus, or making deletion mutants that lack essential domains.

As part of this proposal I will test the redundancy in the gene family by inserting a c-myc gene at the N-myc locus. If c-Myc can truly complement the function of N-Myc, then we should observe a wild type phenotype: if not we should expect a novel or N-myc null phenotype.

C, Tissue specific functions of N-Myc.

N-Myc is expressed extensively in the developing central nervous system (CNS). All the knockouts are lethal prior to the time at which a CNS phenotype might manifest itself. We plan to investigate the function of N-Myc in the CNS, a region in which c-Myc is not expressed. To this end, a targeting scheme has been designed to produce a loxP-site-flanked exon 2. This will enable us to produce spatiotemporal gene ablations in much the same way that implemented in studies of the DNA b polymerase gene by Gu *et al.* (1994).

Transgenes directing Cre recombinase expression to different CNS lineages at different time periods are currently available in the Rossant/Nagy laboratories. These include constructs utilising the nestin enhancer (Zimmerman *et al.*, 1994) and t(a)1 tubulin promoter.

Conclusion.

The work outlined in this proposal will provide a better understanding of the inter-relationship of the Myc family members, throwing some light on their functional redundancy during embryonic development. In addition, the success of this study will provide a critical

assessment of such an ES cell mediated approach applied to the study of gene families involved in cell fate determination during embryogenesis.

References.

- Askew, G.R., *et al.* (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene tag-and-exchange strategy. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4115-4124.
- Ayer, D.E., *et al.* (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* **72**, 211-222.
- Charron, J., *et al.* (1992). Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes & Dev.* **6**, 2248-2257.
- Evan, G.I., *et al.* (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein. *Cell* **69**, 119-128.
- Evan, G.I. and Littlewood, T.D. (1993). The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Gen. Devel.* **3**, 44-49.
- Friedrich, G. and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Dev.* **5**, 1513-1523.
- Gu, H., *et al.* (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164.
- Gu, H., *et al.* (1994). Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-106.

- Hasty, P., *et al.* (1991). Introduction of a subtle mutation into the *Hox-2.6* locus in embryonic stem cells. *Nature* **350**, 243-246.
- Hirning, U., *et al.* (1991). A comparative analysis of N-myc and c-myc expression and cellular proliferation in mouse organogenesis. *Mech. of Dev.* **33**, 119-125.
- Keath, E., *et al.* (1984). Fibroblast lines expressing activated c-myc oncogenes are tumorigenic in nude mice. *Cell* **39**, 184-192.
- Kato, G.J., *et al.* (1992). Max: functional domains and interactions with c-Myc. *Genes & Dev.* **6**, 81-92.
- Larsson, L.G., *et al.* (1994). Expression of mad, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* **9**, 1247-1252.
- Lo, C.W. (1986). Localisation of low abundance DNA sequences in tissue sections by *in situ* hybridisation. *J. Cell Sci.* **81**, 143-162.
- Moens, C.B., *et al.* (1992). A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes & Dev.* **6**, 691-704.
- Mugrauer, G. *et al.* (1988). N-myc proto-oncogene expression during organogenesis in the mouse as revealed by *in situ* hybridisation. *J. Cell Biol.* **107**, 1325.

Nagy, A., *et al.* (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* **110**, 815-821.

Nagy A., *et al.* (1995). *In situ* gene repair by a cre recombinase transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press).

Prendergast, G.C., *et al.* (1991). Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**, 395-407.

Sawai, S., *et al.* (1991). Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse Zygotes. *New Biologist* **3**, 861-869.

Stanton, B.R., *et al.* (1992). Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes & Dev.* **6**, 2235-2247.

Stanton, B.R. and Parada, L.F. (1992). The N-myc proto-oncogene: developmental expression and *in vivo* site-directed mutagenesis. *Brain Path.* **2**, 71-83.

Zervos, A.S., *et al.* (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-232.

Zimmerman, L., *et al.* (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11-24.