

***Caenorhabditis elegans* SDHB-1 modell karakterizálása**

36. OTDK Biológia Szekció

Ősz Fanni

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Biológus MSc II. évfolyam

ELTE TTK Embertani Tanszék

Témavezető:

Dr. Farkas Zsolt

Tanszékvezető:

Dr. Hajdu Tamás



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

Tartalomjegyzék

Bevezető	4
A szukcinát-dehidrogenáz mutációjának szerepe pheochromocytoma és paraganglioma kialakulásában	4
A <i>Caenorhabditis elegans</i> modellállat bemutatása	5
A neuroendokrin eredetű uv1 sejtek	6
Dopaminerg neuronok szerepe <i>C. elegans</i> ban	6
Előzmények	7
Célkitűzések	7
Anyagok és módszerek	8
<i>Caenorhabditis elegans</i> törzsek fenntartása	8
ROS festés	9
Minták előkészítése és fotózása	9
További mikroszkópok	9
Kapott eredmények kiértékelése és ábrázolása	10
Genetikai keresztezés	10
PCR reakciók és primerek	10
Használt oldatok és összetételük	12
Eredmények és megvitatásuk	13
ROS mennyiségének mérése és összehasonlítása vad típusú, valamint SDHB-1 Arg244His pontmutáns fonalférgekben	13
Vad típusú és SDHB-1 Arg244His mutációt hordozó állatok uv1 sejtjeinek azonosítása	14
DAT-1 és SDHB-1 fehérjék kolokalizációjának kimutatása riportertörzsek keresztezésével	18
Összefoglalás és további tervek	19
Köszönetnyilvánítás	21
Irodalomjegyzék	22

Rövidítésjegyzék

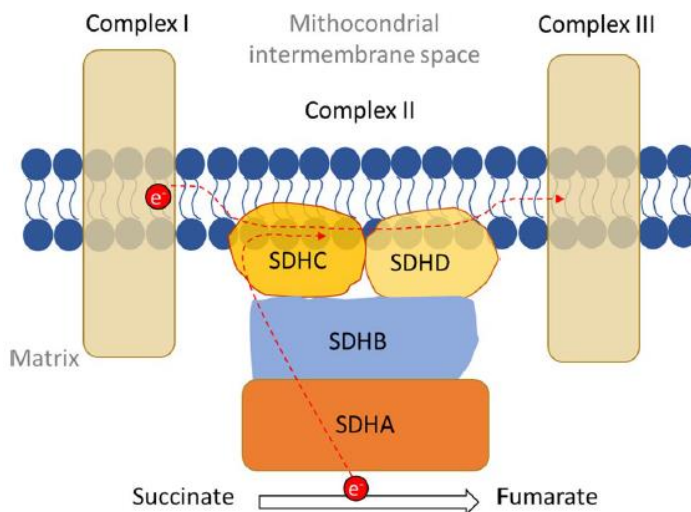
• [131I]-MIBG	¹³¹ I-metaiodobenzylguanidine
• [177Lu]-DOTATATE	¹⁷⁷ Lutetium-[DOTA ^o ,Tyr ³]octreotate
• ATP	<u>A</u> denosine triphosphate
• CVD	cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine
• DAT-1	<u>D</u> opamine transporter-1
• dpy	dumpy
• FACS	<u>F</u> luorescence-activated cell sorting
• GFP	<u>G</u> reen fluorescent protein
• L1-L4	<u>L</u> arval stages <u>1-4</u>
• LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
• NGM	<u>N</u> ematode growth <u>m</u> edium
• PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
• PGL	<u>P</u> araganglioma
• PPGL	Pheochromocytoma/ Paraganglioma
• PHEO	<u>P</u> heochromocytoma
• ROS	<u>R</u> eactive <u>o</u> xygen species
• SDH(A,B,C,D)	<u>S</u> uccinate <u>d</u> ehydrogenase (subunits A, B, C and D)
• SDHAF2	<u>S</u> uccinate <u>d</u> ehydrogenase complex <u>a</u> ssembly <u>f</u> actor <u>2</u>
• SLC6A2	<u>s</u> olute <u>c</u> arrier family <u>6</u> member <u>2</u>
• SWL(B)	<u>S</u> ingle <u>w</u> orm <u>l</u> ysis (<u>b</u> uffer)
• WT	<u>W</u> ild type

Bevezető

A szukcinát-dehidrogenáz mutációjának szerepe pheochromocytoma és paraganglioma kialakulásában

A paraganglioma (PGL), valamint a pheochromocytoma (PHEO) neuroendokrin sejtek tumoros elváltozásához köthető ritka, nagy mértékben örökletes megbetegedések (közös néven pheochromocytoma/paraganglioma; PPGL). A PPGL tumorok kialakulásának mintegy 10-15 %-a a citromsavciklus nem megfelelő működéséhez köthető, melynek hátterében a szukcinát-dehidrogenáz (SDH) enzim négy alegysége (A, B, C és D) és egyik összeszerelő faktoruk (SDHAF2), valamint a fumaráz enzim genetikai kódjának mutációja állhat. Míg a szukcinát-dehidrogenáz C és D alegységeinek (SDHC és SDHD) mutációja kis mértékben, A és B alegységeinek (SDHA és SDHB) mutációja nagy mértékben hajlamosít metasztatikus PPGL kialakulására [1,2].

A szukcinát-dehidrogenáz a sejtek energiatermelésében játszik kulcsszerepet, ugyanis részt vesz a citromsavciklusban, ahol a szukcinát fumaráttá történő átalakításáért felel, valamint a mitokondriális légzési lánc II-es komplexének tagjaként részt vesz az ubikinon ubikinollá történő redukálásában (1. ábra) [3].



1.ábra A szukcinát-dehidrogenáz négy alegysége és azok elhelyezkedése a mitokondrium belső membránjában. A szukcinát-dehidrogenáz részt vesz a mitokondriális légzési láncban, valamint a szukcinát fumaráttá való átalakításáért felel [3].

A szukcinát-dehidrogenáz nem megfelelő működése szukcinát felhalmozódáshoz, valamint hipoxiához vezet [4]. Normoxiás körülmények között a mitokondriumokban fiziológiás szinten termelődnek reaktív oxigén gyökök (ROS), azonban oxigénszegény környezetben megnő a redukzív karboxiláció szintje, mely megnövekedett ROS mennyiséghez vezet, ezáltal elősegítve a tumorsejtek növekedését [4,5]. Sejtvonalakon és modellállatokon végzett kísérletek arra utalnak, hogy a szukcinát-dehidrogenáz mutációja következtében megnövekedett reaktív oxigén gyökök mennyisége szintén elősegíti a tumorsejtek növekedését és proliferációját, [6–8].

A PPGL tumorok (a fej-nyaki paragangliomák kivételével) katekolaminokat (adrenalin, noradrenalin, dopamin) szekretálnak, melyeknek fiziológiás mennyiségüktől eltérő mértékük arányosan befolyásolja a betegség következtében jelentkező tünetek súlyosságát. A betegséget azonban pusztán a tünetei alapján nehéz azonosítani, ugyanis azok rendkívül változatosak és nem specifikusak, ezért a betegség fennállásának gyanúja esetén mindenképp szükséges laborvizsgálatot végezni [10].

A nem-metasztatikus PPGL tumorokat műtéti úton távolítják el. Metasztatikus tumorok esetén – amennyiben lehetséges – a primer daganatot műtét során eltávolítják, majd a beteg sugárterápiában vagy kemoterápiás kezelésben részesül. A leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás kezelések a „CVD” (*cyclophosphamide, vincristine and dacarbazine*) kombináció, illetve a temozolomid monoterápia, míg a leggyakrabban alkalmazott sugárkezelések [¹³¹I]-MIBG-t és [¹⁷⁷Lu]-DOTATATE-t alkalmaznak [2]. Ezek a kezelések azonban legtöbbször palliatívak, valamint nem egyénre szabottak.

Mivel a PPGL tumorok ritka megbetegedések, gyakran örökletesek, valamint személyre szabott kezeléssel nem rendelkeznek, fontos, hogy minél jobban feltérképezzük őket. Ebben segítenek a modelleken végzett kísérletek. Kutatásaim során a szukcinát -dehidrogenáz enzim B alegységének (SDHB) klinikumból származó Arg230His mutációját vizsgálom, melynek *Caenorhabditis elegans* modellállatban az Arg244His mutáció feleltethető meg [11].

A *Caenorhabditis elegans* modellállat bemutatása

A fonálféreg *Caenorhabditis elegans* rendkívül jó genetikai modellállat, ugyanis életciklusa és élethossza rövid (20 °C-on 3,5 nap, illetve két-három hét), szomatikus sejtjeinek száma és leszármazása állandó. A tojásokból kikelve az állatok négy lárvastádiumon (L1-L4)

keresztül érik el a felnőttkort. A populáció mintegy 99,8%-a hímnős és önmegtermékenyítéssel szaporodik, ami elősegíti a genetikai információ stabilitását egy-egy populációban/törzsben. Az állatok kis méretűek (a felnőtt példányok 1 mm hosszúak), testük áttetsző, ezért az állatok intakt formában is vizsgálhatóak fény- és fluoreszcens mikroszkóp alatt. A férgek 12 és 26 °C között, Petri-csészékben tarthatóak, valamint -80°C-on fagyasztva is tárolhatóak (wormbook.org).

A *C. elegans* modell további előnye, hogy potenciális gyógyszerhatóanyagok gyors és nagy mennyiségben történő tesztelésére („screenelésére”) is alkalmas, melynek során a vizsgálni kívánt hatóanyagot az állatok fenntartására használt szilárd táptalajba (NGM-*Nematode Growth Medium*) vagy annak felületére juttatják [12]. Ezt követően vizsgálható a gyógyszerjelölt hatása az állatokra azok fenotípusának, élethosszának vagy mozgásának a megfigyelésén keresztül.

A *C. elegans* fehérjék mintegy 41%-a rendelkezik humán ortológgal [13], valamint a fonálféregben az SDHB-1 fehérjét kódoló gén 60% egyezést és 84% hasonlóságot mutat az emberi ortológjával [11].

A neuroendokrin eredetű uv1 sejtek

Érdekes módon, bár az SDHB mutációja az örökletes PPGL daganatos betegek minden sejtjében jelen van, tumorok csak a neuroendokrin szövetekben alakulnak ki. *C. elegansban* is megtalálhatóak neuroendokrin sejtek, melyek közül a négy uv1 sejt intenzíven kutatott. Az uv1 sejtek az uterus kialakításában és a peterakásban vesznek részt (<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/egglaying%20apparatus/Eggframeset.html>). Az Arg244His homozigóta recesszív állatok a vad típusú állatoknál rövidebb ideig élnek és sterilek [11], mely alapján arra következtethetünk, hogy az SDHB-1 fehérjének fontos szerepe lehet az uv1 sejtek működésében.

Dopaminerg neuronok szerepe *C. elegansban*

A szukcinát-dehidrogenáz mutációja okozta PPGL tumoros betegek esetében megnő a noradrenalin és a dopamin szekréciója [14], azonban ennek szerepe a tumor kialakulásában még nem ismert. *C. elegansban* négyféle biogén amin fordul elő (dopamin, szerotonin, oktopamin és tiramin), melyeknek az állatok megváltozott környezethez történő alkalmazkodásában van szerepe, azok peterakási, mozgási, tanulási és garatmozgatói folyamatainak helyes kialakításán keresztül. A dopamin – mely fonálféregben és emlős agyban hasonló biológiai útvonalakban és

folyamatokban vesz részt - fontos neurotranszmitter, mely a mechanoszenzoros érzékelés kialakításán át vesz részt az állatok megváltozott környezethez való alkalmazkodásában, hiányában pedig változás áll be az állatok mozgásában, valamint tanulási képességeiben. *C. elegans* hermafroditákban nyolc, hímekben pedig tizennégy dopaminerg sejt található, melyek hat típusba sorolhatók be (ADE, PDE, CEP, R5A, R7A, R9A) (http://www.wormbook.org/chapters/www_monoamines/monoamines.html).

Előzmények

A szukcinát-dehidrogenáz klinikailag releváns Arg230His pontmutációja következtében kialakuló PPGL tumorok vizsgálata érdekében az elmúlt években csoportunk egy új fonálféreg modellt állított elő. Az Arg244His mutációt hordozó törzsben egy G731A nukleotidcsere funkcióvesztéses szukcinát-dehidrogenáz termelődést eredményez, melynek következtében szukcinát halmozódik fel az állatok sejtjeiben. Továbbá magasabb glikolitikus aktivitásra utaló emelkedett piruvát- és laktát-szint is megfigyelhető. A pontmutáns állatok oxigénfogyasztása csökkent mitokondrium- és ATP-mennyiség jelenlétében a vad típusú állatokéval szemben alulmarad. A metabolikus átrendeződés mellett az Arg244His állatokat rövidebb élethossz, lassabb egyedfejlődés (a felnőttkort 4-5 nap alatt érik el) és sterilitás is jellemzi [11].

Célkitűzések

SDHB-1 mutációval rendelkező *C. elegansokból* még nincsen adat, mely alátámasztaná a megnövekedett ROS szintet, ezért kutatásom során összehasonlítom a vad típusú és az Arg244His pontmutáns férgek ROS termelését. Amennyiben a megemelkedett ROS szint kimutatható, a termelődését gátló szerek lehetséges terápiás alkalmazása megfontolandó. A gátlószerek elsődleges modellben való tesztelésére a *C. eleganson* végzett screen kísérletek a legalkalmasabbak gyorsaságuk és költséghatékonyságuk miatt.

C. elegans uv1 sejtokban vizsgálom az SDHB-1 fehérje szerepét. Ehhez uv1-specifikus riportert hordozó törzzsel keresztezem az Arg244His állatokat és megfigyelem, hogy az SDHB-1 mutációja milyen hatással van az uv1 sejtek működésére és az uterus kialakulására.

Az Arg244His pontmutáció hatását vizsgálom a dopamin szekréciójára *C. elegans*ban. *dat-1::gfp* riportert hordozó állatokat *sdhb-1::mCherry* riportert hordozókkal keresztezem annak érdekében, hogy megfigyelhessem mely neuronokban fordul elő a DAT-1 és az SDHB-1 fehérjék kolokalizációja. A *C. elegans* dopaminerg neuronokban expresszálandó *dat-1* (emberi megfelelője az SLC6A2; solute carrier family 6 member 2) a dopamin transzmembrán transzportjában játszik szerepet (https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000934#0-9f-10).

Anyagok és módszerek

Caenorhabditis elegans törzsek fenntartása

A vizsgált fonálféreg törzseket termosztátban, 16 °C-on tartottam. Táplálékként *Escherichia coli* OP50 baktérium pázsitot biztosítottam az állatok számára, melyet LB (Luria-Bertani) folyékony tápoldatban növesztettem, majd Petri-csészékbe öntött agarlemezre (NGM; *Nematode Growth Medium*) cseppentettem. Az állatokat a baktérium pázsitra platina tű segítségével helyeztem [15].

Vizsgált fonálféreg és genotípusuk:

Törzs neve/azonosítója	Genotípus
WT (wild type): N2 (var Bristol)	vad típus
CGC: VC294; WormBase: WBStrain00035655	<i>sdhb-1(gk165)/mIn1 [mIs14 dpy-10(e128)] II.</i>
R244H (balanced)*	<i>sdhb-1(gk165)/ mIn1 [mIs14 [myo-2::gfp; pes-10::gfp] dpy10(e128)] II.; unc-119(ed3) III.(?); pNU636 (sdhb-1p::sdhb-1(G731A)::sdhb-1 3'UTR; unc119(+)) X</i>
CGC: LX1986; WormBase: WBStrain00026419	<i>vsIs177 lite-1(ce314) lin-15B& lin-15A(n765) X.</i>

R244H; uv1::mCherry ^{ls}	sdhb-1(gk165)/ mIn1 [mIs14 [myo-2::gfp; pes-10::gfp] dpy10(e128)] II.; unc-119(ed3) III.(?); pNU636 (sdhb-1p::sdhb-1(G731A)::sdhb-1 3'UTR; unc119(+)); vsIs177 lite-1(ce314) lin-15B& lin-15A(n765) X.
CGC: TG2401; WormBase: WBStrain00034689	dat-1(ok157) III; vtIs1 ^{**} V; tsp-17(gt1681) X
TBV03 (sdhb-1::mCh)	sdhb-1::mCh II.

1.táblázat *A kutatásom során használt C. elegans törzsek azonosítója és genotípusa*

*Ez a törzs az X kromoszómára integrált transzgénként hordozza az Arg244His pontmutáns allélt, a II. kromoszómán pedig genomi delécio (gk165) miatt nem fejeződik ki az *sdhb-1*. Ennek következtében a homozigóta pontmutáns állatok csak a pontmutáns fehérjét termelik. Mivel a homozigóta pontmutáns állatok sterilek, a II. kromoszómán balanszer (mIn1) segíti a törzs fenntartását.

****vtIs1[dat-1::gfp+rol-6(su1006)]V**

ROS festés

A ROS szintek kimutatására vad típusú és Arg244His pontmutáns állatokban CellROX[®] Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) festéket használtam. A 2.5 mM koncentrációjú festéket 1:500 arányban oldottam M9 pufferoldatban, majd a fonalférgeket 20 percig, 20 °C-on inkubáltam[16].

Minták előkészítése és fotózása

Az állatokat tárgylemezen agarpadra cseppentett desztillált vízbe helyeztem, majd Na-aziddal paralizáltam és fedőlemezzel fedtem. A képek Dr. Boda Attila segítségével AxioImager M2 epifluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss) és AxioCam MRm kamerával készültek. A mikroszkóp szemikonfokális ApoTomel készülékkel volt felszerelve. Használt objektívek: Plan-Neofluar 10x, 0.3 NA, 20x, 0.5 NA. Használt szoftver: Zeiss ZEN PRO

További mikroszkópok

Alpha STO-3-45T sztereo mikroszkóp, ZEISS Lumar sztereo mikroszkóp

Kapott eredmények kiértékelése és ábrázolása

A ROS-szint mérés adatainak kiértékelése során a készített képeket ImageJ szoftverrel szemikvantifikáltam, majd a statisztikai elemzést RStudio segítségével végeztem. A vizsgált törzsekből 37-37 állatot elemeztem. Az adatokat RStudio segítségével ábrázoltam. Az adatok mindkét vizsgált csoportban normális eloszlást mutattak (Shapiro-Wilk teszt), ezért kétmintás t-próbával hasonlítottam össze őket.

Genetikai keresztezés

A *C. elegans* mint modellszervezet további előnye, hogy bár a hermafrodita állatok önmegtermékenyítésre képesek, mellyel stabilan lehet homozigóta allélokat fenntartani, eltérő mutációt hordozó hímekkel keresztezve őket, a hímek spermiuma előnyt élvez a megtermékenyítés során. Így lehetőség van kettős vagy többszörös mutáns állatok előállítására. A keresztezés eredményeként létrejött F2 nemzedékben szűrhetünk kettős vagy többszörös homozigóta állatokra. A genotipizálás során a jól látható fenotípussal rendelkező mutáns állatok akár mikroszkóp segítségével szelektálhatóak. Amennyiben nem lehetséges csupán fenotípus alapján a kívánt állatok megkülönböztetése, lehetőség van a genotípus megállapítására marker mutációt hordozó keresztezéssel vagy a mutáció molekuláris hátterének kimutatásával is (pl. *Single Worm PCR*).

PCR reakciók és primerek

a) *Single Worm Lysis* protokoll

1. 25 °C 5:00'
2. 42 °C 60:00'
3. 70 °C 5:00'

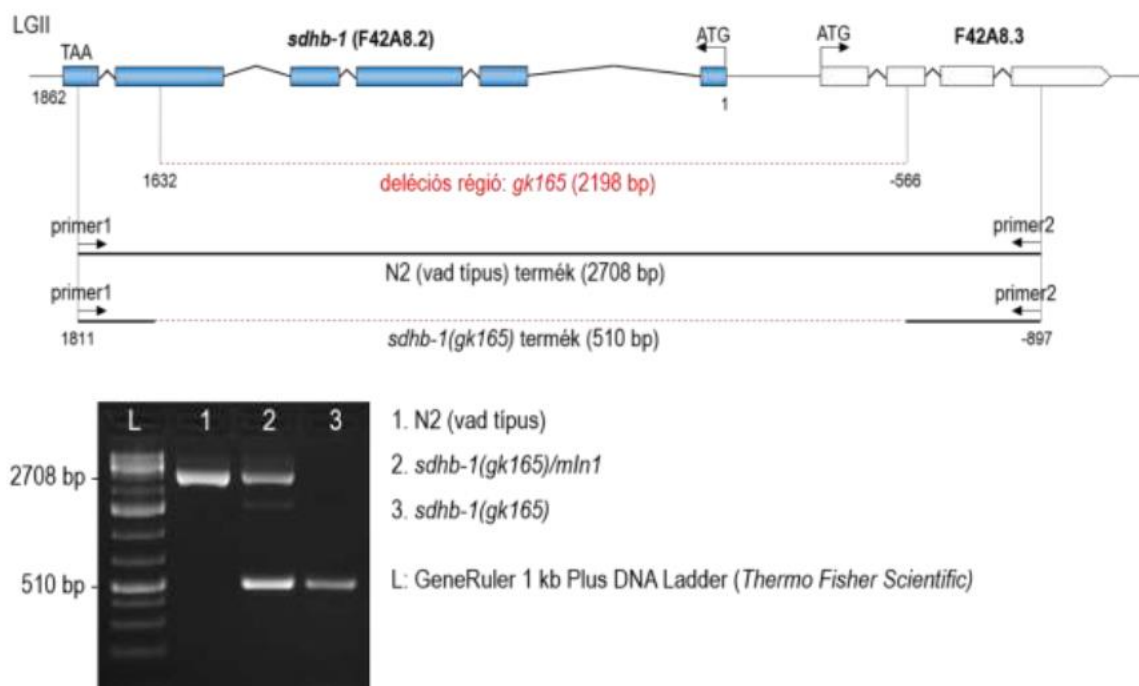
b) *sdhb-1(gk165)* deléción kimutatása:

forward primer: 5'-TGAAATTGCATTGTCCTCTCAC-3'

reverz primer: 5'-CGATTTGATCTCTCCGATGG-3'

PCR profil

1. 95 °C 2:00'
2. 95 °C 0:30' ←
3. 52 °C 0:30' ← 36x
4. 72 °C 4:00'
5. 72 °C 5:00'
6. 12 °C ∞'



2.ábra *SDHB1(gk165)* deléció kimutatása [17]: Vad típusú (N2) állatok esetén csak egy 2708 bp hosszú termék, míg homozigóta mutáns állatok esetén csak egy 510 bp hosszú termék jelenik meg a géleképén. A deléciót és a balanszert egyaránt hordozó, heterozigóta állatok esetén két termék (2708 bp és 510 bp) jelenik meg a géleképén.

c) *sdhb-1p::SDHB1(G731A)::sdhb-1u* transzgén kimutatása:

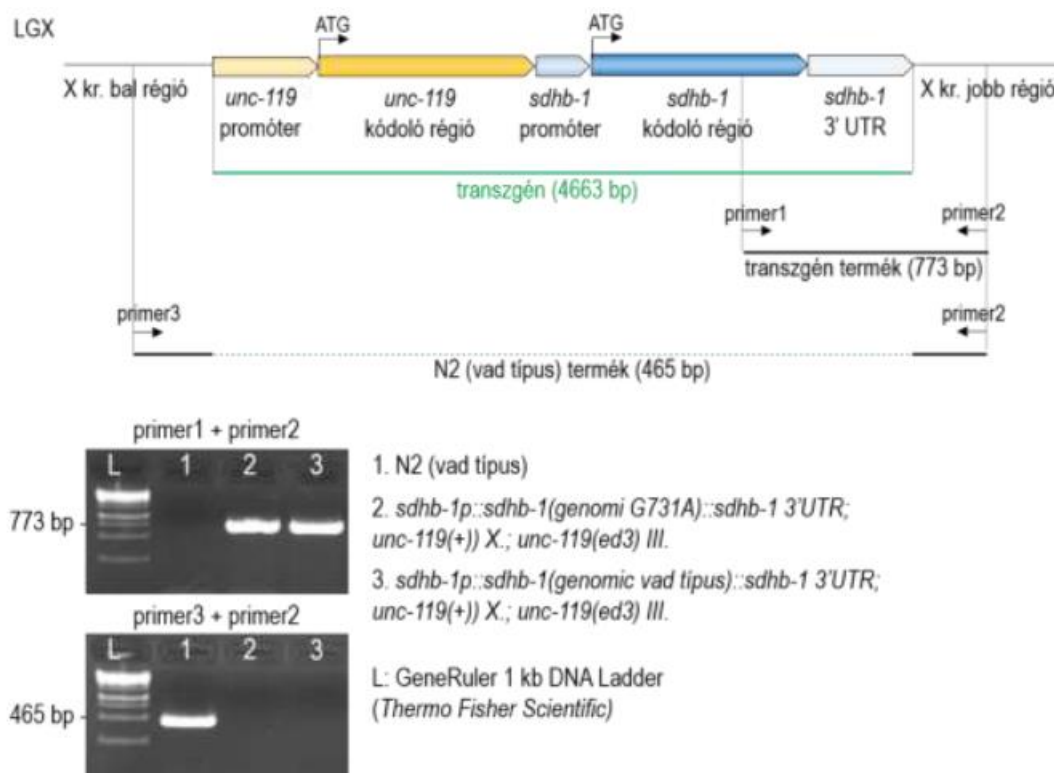
forward primer 1: 5'-GATCAAATCGCTGCTTACTG-3'

forward primer 2: 5'-CATTTGATCAGCGTAGTTGC-3'

reverz primer: 5'-ATTCTTTCTCCTAGCCTTCG-3'

PCR profil

- | | | | |
|----|-------|-------|-------|
| 1. | 95 °C | 2:00' | |
| 2. | 95 °C | 0:30' | ← 34x |
| 3. | 53 °C | 0:30' | |
| 4. | 72 °C | 1:30' | |
| 5. | 72 °C | 5:00' | |
| 6. | 12 °C | ∞' | |



3.ábra *SDHB1(G731A)* transzgén kimutatása [17]: A forward primer 1 (ábrán primer1) és a reverz primer (ábrán primer2) 773 bázispár hosszú transzgén-specifikus terméket, a forward primer 2 (primer3) és a reverz primer pedig 465 bázispár hosszú, vad típusú terméket eredményez a PCR reakció során, ugyanis a transzgén termék (4663 bázispár) túl nagy ahhoz, hogy amplifikálódjon. A vad típusú, transzgént nem hordozó állatokban csak a forward primer 2 és a reverz primer alkalmazásával kapunk PCR terméket. A transzgénre homozigóta állatokban csak a forward primer 1 és a reverz primer alkalmazásával kapunk PCR terméket, míg a transzgénre heterozigóta állatokban mindkét primer pár alkalmazásával kapunk PCR terméket [17].

Használt oldatok és összetételük

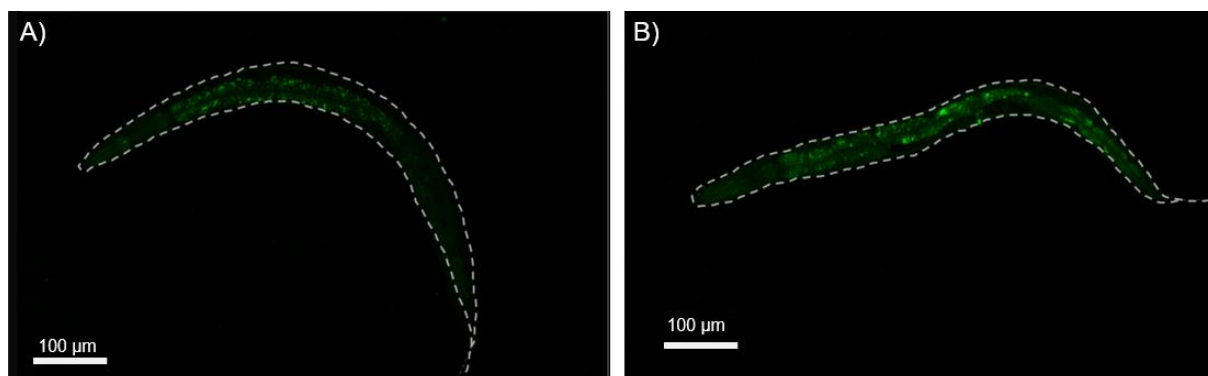
LB tápoldat, NGM agarlemez, valamint M9 pufferoldat összetétele szakirodalom alapján [15].

Single Worm Lysis során SWLB-t (*Single Worm Lysis Buffer*; 50mM KCl, 10nM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20) a genomi DNS izolálásához használtam, majd *Proteinase K* (*Thermo Scientific*) segítségével eltávolítottam a fehérjéket. A kinyert DNS-t SW (*Single Worm*) PCR során amplifikáltam.

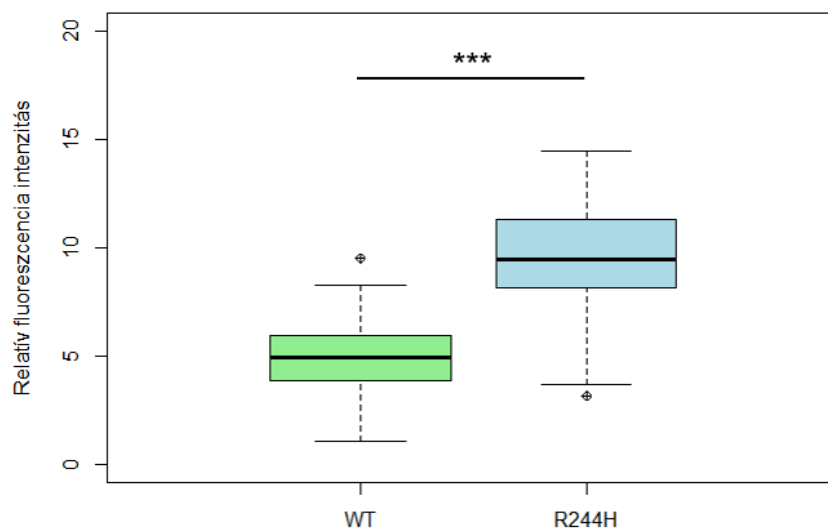
Eredmények és megvitatásuk

ROS mennyiségének mérése és összehasonlítása vad típusú, valamint SDHB-1 Arg244His pontmutáns fonalférgekben

Vad típusú (N2), valamint Arg244His (R244H) pontmutáns törzsekből L4/fiatal felnőtt állatokat válogattam (vad típusú férgekben idősebb korban a tojások torzíthatták volna a mérési adatokat) és 20 percig ROS-festékben inkubáltam. A festést követően az állatokat tárgylemezen agarpadra cseppentett desztillált vízbe helyeztem, majd epifluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam. Mindkét törzsből 37-37 állatról képeket készítettem (**4. ábra**), melyek alapján ImageJ szoftverrel állapítottam meg az egyedi állatok ROS-szintjét. Az így kapott adatokat felhasználva boxplot diagramot készítettem (**5. ábra**), valamint kétmintás t-próbával hasonlítottam össze a vad és a pontmutáns populációkat. A statisztikai vizsgálat alapján szignifikáns eltérés ($p = 5.082 \cdot 10^{-13}$) figyelhető meg a két törzs ROS termelése között.



4.ábra Vad típusú (A) és R244H (B) pontmutáns állatok CellROX[®] Green festékkel vizsgált ROS termelése: A képeken szabad szemmel is jól látható, hogy az Arg244His pontmutánsban nagyobb a reaktív oxigénradikálok termelődési szintje.



5.Ábra *Vad típusú (WT) és SDHB-1 Arg244His mutációt hordozó (R244H) állatok ROS termelésén alapuló relatív fluoreszcencia intenzitás értékek összehasonlítása (***: $p < 0,001$)*

Vad típusú és SDHB-1 Arg244His mutációt hordozó állatok uv1 sejtjeinek azonosítása

Ahhoz, hogy az Arg244His pontmutáció hatását vizsgálhassuk az uterus neuroendokrin eredetű uv1 sejtjeire, először szándékunkban állt azonosítani az uv1 sejtek jelenlétét a pontmutáns állatokban. Ehhez uv1-specifikus riportert (*ocr-2p::mCherry*) hordozó törzzsel (Lx1986) kereszteztam az R244H állatokat.

P: ♀ *gk165/mIn1*; +/+; *TRG/TRG* X ♂ +/+; *uv1/Ø*; +/Ø

TRG: G731A pontmutáns transzgén az X kromoszómán

uv1: uv1-specifikus mCherry riportert az X kromoszómán

gk165: *sdhb-1* null allél a II. kromoszómán

mIn1: *sdhb-1* balanszer a II. kromoszómán, GFP markerrel

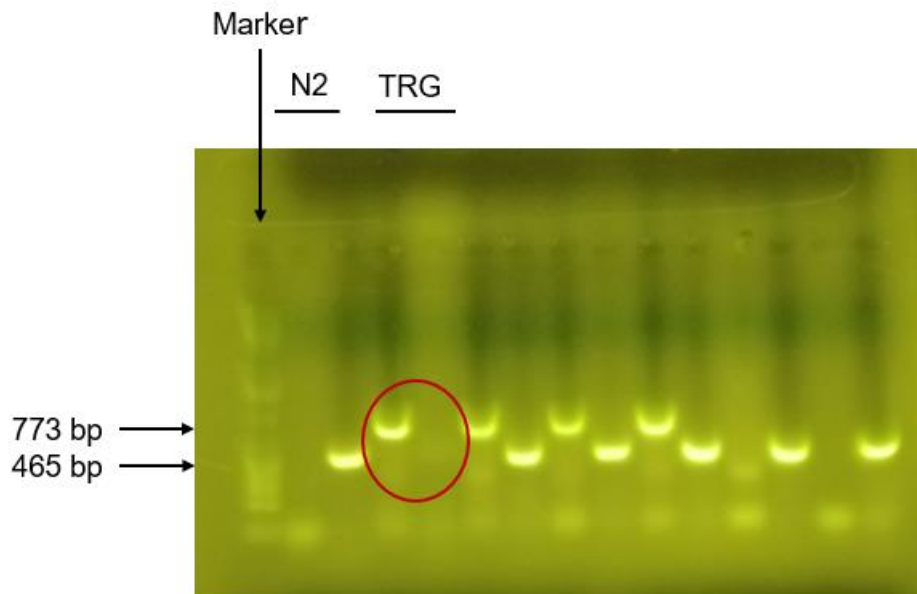
+: vad allél

F1:

♂ ♀	gk165; +; TRG	mIn1; +; TRG
+; uv1; +	gk165/+; uv1/+;TRG/+	mIn1/+; uv1/+; TRG/+
+; Ø; Ø	gk165/+; +/Ø; TRG/Ø	mIn1/+; +/Ø; TRG/Ø

2.táblázat Az *uv1* riportert (*ocr-2p::mCherry*) hordozó Lx1986, valamint az Arg244His pontmutáns R244H törzsek keresztezése után az F1 generáció genotípusait tartalmazó táblázat. Annak érdekében, hogy *gk165/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG* allélokat hordozó törzset tudjak előállítani, az első keresztezés után a táblázatban színes háttérrel kiemelt, *mIn1/+; uv1/+; TRG/+* állatokra szűrtem.

Az első keresztezés után az F1 generációban az utódok genotípusa többféle (2. táblázat), azonban nincs köztük olyan állat, aki a *gk165/mIn1* allélokat hordozza. Ahhoz, hogy a II. kromoszómán a *gk165/mIn1* allélokat visszakapjam, újabb keresztezést végeztem. Ehhez azonban először az F2 utódgenerációból *mIn1/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG* homozigóta hermafroditákra volt szükségem a következő keresztezéshez. A genotipizálás során segítségemre volt, hogy az *mIn1* balanszer GFP jelöléssel ellátott, valamint homozigóta formában *dpy* (dumpy) fenotípust, azaz rövidebb testhosszt eredményez. Az *ocr-2p::mCherry* riporterre sztereo lumar mikroszkóp alatt lehet szűrni. A G731A transzgén azonban nincs ellátva markerrel, azonosítása molekuláris módszerrel, *Single Worm* PCR-rel lehetséges. Azok az állatok hordozzák a pontmutáns transzgént homozigóta formában, akikben csak a forward primer 2 és a reverz primer használatával figyelhető meg termék (6. ábra).



6.ábra *G731A* transzgénre homozigóta állatok azonosítása: A transzgént nem hordozó kontroll (N2), vad típusú állat PCR termékei mellett transzgénre homozigóta (TRG) állat PCR termékei figyelhetők meg.

Következő lépésként az *mIn1/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG* állatokat *gk165/+; +/-; +/-* állatokkal (VC294) kereszteztem annak érdekében, hogy a *gk165/mIn1* allélokat visszanyerjem. Az F1 generáció genotípusait a **3. táblázat** tartalmazza.

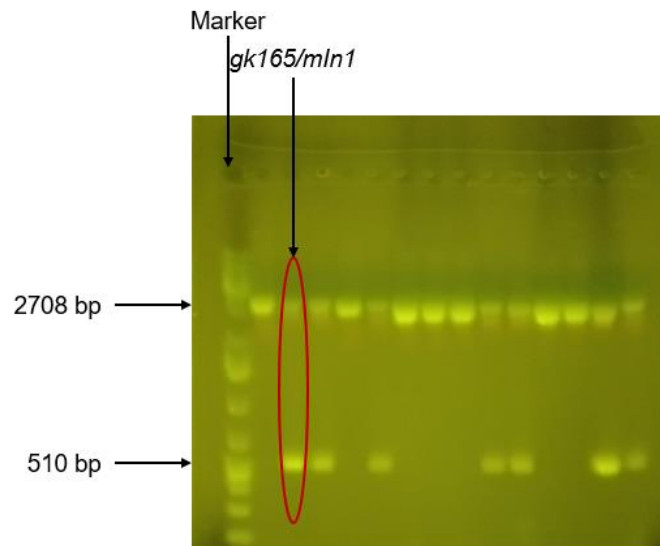
P: ♀ *mIn1/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG* X ♂ *gk165/+; +/-; +/-*

F1:

♂ \ ♀	<i>mIn1; uv1; TRG</i>	<i>mIn1; uv1; TRG</i>
	<i>gk165; +; +</i>	<i>gk165/mIn1; uv1/+; TRG/+</i>
<i>gk165; +; +</i>	<i>gk165/mIn1; uv1/+; TRG/+</i>	<i>gk165/mIn1; uv1/+; TRG/+</i>
<i>+; Ø; Ø</i>	<i>mIn1/+; uv1/Ø; TRG/Ø</i>	<i>mIn1/+; uv1/Ø; TRG/+</i>

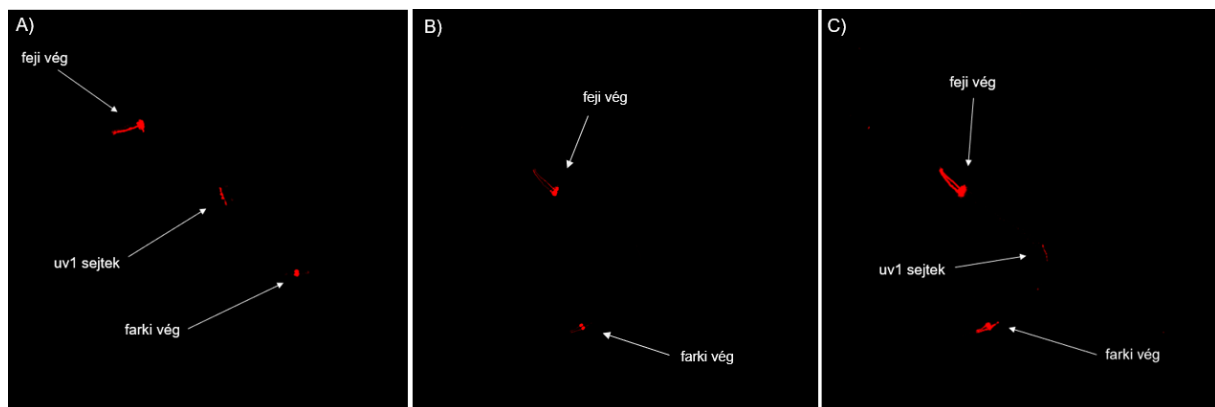
3.táblázat Az *mIn1/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG*, valamint a *gk165/+; +/-; +/-* allélokkal rendelkező állatok keresztezéséből származó F1 generáció genotípusai. A szürkével jelölt állatokra szűrtem.

A keresztezés sikeressége a balanszer kromoszómára és az *uv1* markerre sztereo lumar mikroszkóp alatt vizsgálható. A *gk165* deléció, valamint a G731A transzgén jelenléte az állatok genomjában *Single Worm PCR*-rel mutatható ki (7. és 6. ábrák). Az F2 generációból *gk165/mIn1; uv1/uv1; TRG/TRG* állatokra szűrve létrehoztam egy R244H; *uv1::mCherry*^{Is} törzset, mely egyaránt rendelkezik az Arg244His mutációval, valamint az *uv1* markerrel.



7.ábra A *gk165* deléció jelenlétének kimutatása PCR segítségével. Az *mIn1* balanszert homozigótaként hordozó állatok esetén csak egy 2708 bp hosszú vad termék jelenik meg a gélképen, míg a deléciót és a balanszert egyaránt hordozó állatok esetén két termék (2708 bp és 510 bp) jelenik meg a gélképen.

A keresztezések elvégzése után a vad típusú, *uv1* markerrel rendelkező (Lx1986), valamint a létrehozott R244H; *uv1::mCherry*^{Is} törzs állatait epifluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam (8. ábra).



8.ábra Az *uv1* markert hordozó *Lx1986* (A), valamint *R244H; uv1::mCherry^{ls}* (B, C) törzsekről készült epifluoreszcens képek. A pontmutáns törzs állataiban csak felerősített kontraszt és fényerő eredményeként láthatóak az *uv1* sejtek. (Az ábra B) és C) része ugyanazon mikroszkópos kép nem felerősített, illetve felerősített változata.)

Vad típusú állatokban az *uv1*-specifikus *ocr-2p::mCherry* riportert expressziója az állatok vulvájának tájékán jól látható. Az mikroszkópos elemzést az idő rövidsége miatt SDHB-1 Arg244His mutáns állatokban még csak kis elemszámú, fiatal pontmutáns állatban vizsgáltam, így további mérések szükségesek. Eddig úgy tűnik, hogy R244H állatokban nagyon gyengén, de kifejeződik vulva tájékon is az *uv1* riportert.

DAT-1 és SDHB-1 fehérjék kolokalizációjának kimutatása riportertörzsek keresztezésével

Az Arg244His pontmutáció dopaminerg neuronokra kifejtett hatásának vizsgálata érdekében *dat-1::gfp* és *sdhb-1::mCherry* riportert hordozó állatokat kereszteztem a DAT-1 és az SDHB-1 fehérjék kolokalizációjának kimutatásához. A *dat-1::gfp* riportert az V. kromoszómán (*vtls1[dat-1::gfp+rol-6(su1006)]V*), az *sdhb-1::mCherry* pedig a II. kromoszómán található. A keresztezés menete alább látható:

P: ♀ *+/+; dat-1::gfp/dat-1::gfp* X ♂ *sdhb-1::mCh/sdhb-1::mCh; +/+*

+: vad allél

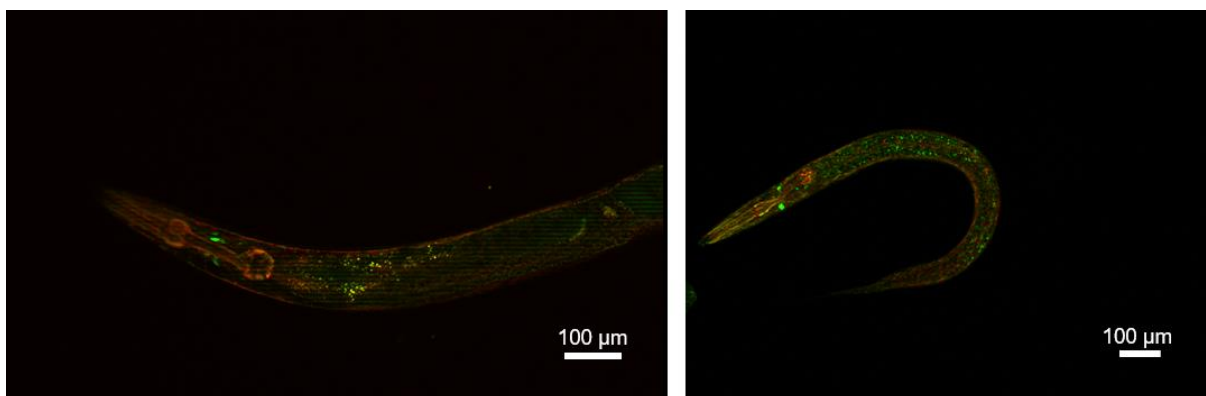
F1:

♀ \ ♂	♀ <i>+/+; dat-1::gfp</i>	♂ <i>+/+; dat-1::gfp</i>
♂ <i>sdhb-1::mCh; +</i>	<i>sdhb-1::mCh/+; dat-1::gfp/+</i>	<i>sdhb-1::mCh/+; dat-1::gfp/+</i>
♀ <i>sdhb-1::mCh; +</i>	<i>sdhb-1::mCh/+; dat-1::gfp/+</i>	<i>sdhb-1::mCh/+; dat-1::gfp/+</i>

4. táblázat A *dat-1::gfp* és az *sdhb-1::mCherry* riportert hordozó állatok keresztezéséből származó F1 utódgeneráció genotípusai

A 4. táblázat az F1 generáció genotípusait tartalmazza, az F2 generációban azonban már *sdhb-1::mCherry/sdhb-1::mCherry; dat-1::gfp/dat-1::gfp* genotípusú utódok is

megfigyelhetők. A két riporterrel rendelkező állatokról epifluoreszcens képeket készítettem (9. ábra), melyek egyelőre előzetes eredmények, amik alapján egyértelmű kolokalizációt nem lehet megállapítani. A DAT-1 és az SDHB-1 kolokalizációjának azonosítása nagyobb elemszámú minta konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatával további terveim között szerepel.



9.ábra A *dat-1::gfp* és *sdhb-1::mCherry* riporterrel rendelkező, *SDHB-1* vad típusú állatok (bal oldalon felnőtt, jobb oldalon L3 stádiumú lárva) epifluoreszcens mikroszkóppal készített képe

Összefoglalás és további tervek

Kutatásaim célja az új, *SDHB-1* Arg244His *C. elegans* pheochromocytoma/paraganglioma tumormodell további karakterizálása volt, mely segíthet jobban megérteni és feltérképezni ezen ritka, nagymértékben örökletes daganatok kialakulásának molekuláris hátterét. Kísérleteim három vonalon végeztem.

A ROS festés és epifluoreszcens mikroszkópia segítségével intakt állatokban sikerült megfigyelni, hogy az Arg244His pontmutáció következtében *C. elegansban* megnövekszik a reaktív oxigéngyökök mennyisége. Ez az eredmény összevág a sejtvonalakon és más modellállatokon végzett kísérletek irodalmi adataival, melyek arra utalnak, hogy a szukcinát-dehidrogenáz mutációja következtében megnövekszik a reaktív oxigéngyökök mennyisége. Továbbá az ezen a modellen megfigyelt csökkent oxigén fogyasztásból is elvárható volt a megnövekedett ROS szint, melyet sikerült kimutatni.

Annak érdekében, hogy rávilágítsunk arra, hogy az örökletes *SDHB* mutációval rendelkező PPGL tumoros betegek esetén miért csak a neuroendokrin szövetekben alakulnak

ki tumorok, Arg244His pontmutáns *C. elegans*okban vizsgáltam a neuroendokrin eredetű uv1 sejteket. A kis elemszámú minta következtében azonban mCherry uv1 riporter használatával nem lehet biztosan eldönteni, hogy az Arg244His mutáns fonálférgek vajon rendelkeznek-e a neuroendokrin eredetű uv1 sejtekkel és ha igen, akkor azok expressziója mennyiben tér el a vad típusú állatokétól. Amennyiben sikerül az uv1 sejteket azonosítani a pontmutáns állatokban, lehetőség van egysejtes transzkriptomikai vizsgálat elvégzésére, amelynek során az uv1 sejtek génjeinek expressziós szintjét mérem, azok mRNS-ének mennyiségi meghatározásán keresztül. Ennek első lépéseként a férgeket kémiai módszerrel egyedi sejtekre kell bontani, majd fluoreszcencia-aktivált sejtválogatást (FACS) végezni [18]. Ezt megkönnyítendő, az mCherry marker által festett más sejttypusok elkülönítése céljából egy más színű, többnyire uv1 specifikus markert (*ida-1::gfp*) tervezek bejuttatni az R244H állatokba annak érdekében, hogy a kolokalizációt mutató uv1 sejtekre könnyebben tudjak szűrni.

A PPGL tumorokra jellemző megnövekedett katekolamin szekréció szerepének megismerése érdekében *C. elegans*ban szerettem volna azonosítani olyan neuronokat, melyekben megfigyelhető a DAT-1 és az SDHB-1 koexpressziója. Ennek első lépéseként létrehoztam egy olyan törzset, mely *sdhb-1*- és *dat-1*- specifikus riporterekkel rendelkezik, azonban egyértelmű kolokalizációt nem sikerült kimutatni. A DAT-1 és SDHB-1 fehérjéket koexpresszáló neuronok azonosítása konfokális mikroszkópiával további vizsgálatokat igényel. Sikeres azonosítás után további tervem a *dat-1::gfp* riporter *sdhb-1* Arg244His pontmutáns háttérrel rendelkező állatokba történő keresztezése annak érdekében, hogy megfigyelhessem, miként befolyásolja az SDHB-1 fehérje struktúrájának változása a dopamint szekretáló neuronok működését és az azok által szabályozott folyamatokat.

Összességében mindhárom vonalon sikerült előre lépni, de még sok kísérlet van hátra, melyek modellünk karakterizálásában és lehetséges tumormodellként való alkalmazásában segíthetnek. Reméljük, hogy egy működő modell felállítása segíthet a PPGL tumorok későbbi egyedi terápiás kezelésének kialakításában.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Farkas Zsolt-nak, hogy szakértelmével, iránymutatásával és hasznos magyarázataival segítette kutatásaimat, valamint dolgozatom elkészülését.

Szeretnék köszönetet mondani laborvezetőnknek, Vellainé Dr. Takács Krisztinának a kísérletekhez elengedhetetlen infrastrukturális háttér biztosításáért, valamint a kutatásom során nyújtott hasznos tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Dr. Boda Attilának az epifluoreszcens mikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni az ELTE Embertani Tanszék munkatársainak és hallgatóinak, hogy kutatómunkámat kellemes légkörben végezhettem.

A Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-22-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL



Irodalomjegyzék

- [1] J. Crona, D. Taïeb, and K. Pacak, "New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification," *Endocr Rev*, vol. 38, no. 6, p. 489, Dec. 2017, doi: 10.1210/ER.2017-00062.
- [2] S. Nölting *et al.*, "Personalized Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma," *Endocr Rev*, vol. 43, no. 2, p. 199, Apr. 2022, doi: 10.1210/ENDREV/BNAB019.
- [3] K. Takács-Vellai, Z. Farkas, F. Ősz, and G. W. Stewart, "Model systems in SDHx-related pheochromocytoma/paraganglioma," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 40, no. 4, pp. 1177–1201, Dec. 2021, doi: 10.1007/S10555-021-10009-Z.
- [4] P. J. Pollard *et al.*, "Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations," *Hum Mol Genet*, vol. 14, no. 15, pp. 2231–2239, Aug. 2005, doi: 10.1093/HMG/DDI227.
- [5] D. C. Fuhrmann and B. Brüne, "Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia," *Redox Biol*, vol. 12, p. 208, Aug. 2017, doi: 10.1016/J.REDOX.2017.02.012.
- [6] A. R. Mullen *et al.*, "Reductive carboxylation supports growth in tumor cells with defective mitochondria," *Nature*, vol. 481, no. 7381, p. 385, Jan. 2012, doi: 10.1038/NATURE10642.
- [7] B. G. Slane *et al.*, "Mutation of Succinate Dehydrogenase Subunit C Results in Increased O₂–, Oxidative Stress, and Genomic Instability," *Cancer Res*, vol. 66, no. 15, pp. 7615–7620, Aug. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0833.
- [8] R. D. Guzy, B. Sharma, E. Bell, N. S. Chandel, and P. T. Schumacker, "Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis," *Mol Cell Biol*, vol. 28, no. 2, p. 718, Jan. 2008, doi: 10.1128/MCB.01338-07.
- [9] L. Tretter, A. Patocs, and C. Chinopoulos, "Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1857, no. 8, pp. 1086–1101, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.BBABIO.2016.03.012.
- [10] J. W. M. Lenders *et al.*, "Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension," *J Hypertens*, vol. 38, no. 8, p. 1443, Aug. 2020, doi: 10.1097/HJH.0000000000002438.
- [11] É. Saskói *et al.*, "The SDHB Arg230His mutation causing familial paraganglioma alters glycolysis in a new *Caenorhabditis elegans* model," *Dis Model Mech*, vol. 13, no. 10, Oct. 2020, doi: 10.1242/DMM.044925.
- [12] S. Bulterijs and B. P. Braeckman, "Phenotypic Screening in *C. elegans* as a Tool for the Discovery of New Geroprotective Drugs," *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 8, pp. 1–35, Aug. 2020, doi: 10.3390/PH13080164.
- [13] W. Kim, R. S. Underwood, I. Greenwald, and D. D. Shaye, "OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and *Caenorhabditis elegans* Genes," *Genetics*, vol. 210, no. 2, p. 445, Oct. 2018, doi: 10.1534/GENETICS.118.301307.

- [14] B. D. Pereira, H. V. Luiz, A. G. Ferreira, and J. Portugal, "Genetics of Pheochromocytoma and Paraganglioma," *Paraganglioma: A Multidisciplinary Approach*, pp. 1–22, Jul. 2019, doi: 10.15586/PARAGANGLIOMA.2019.CH1.
- [15] S. Brenner, "The genetics of *Caenorhabditis elegans*," *Genetics*, vol. 77, no. 1, pp. 71–94, May 1974, doi: 10.1093/GENETICS/77.1.71.
- [16] H. Min, M. Lee, K. S. Cho, H. J. Lim, and Y. H. Shim, "Nicotinamide supplementation improves oocyte quality and offspring development by modulating mitochondrial function in an aged *caenorhabditis elegans* model," *Antioxidants*, vol. 10, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10040519/S1.
- [17] Saskóí Éva, "Tumorsuppresszor homológok fejlődésgenetikai elemzése *Caenorhabditis elegans* modellorganizmusban," Eötvös Loránd University, Budapest, 2020.
- [18] R. Kaletsky *et al.*, "The *C. elegans* adult neuronal IIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators," *Nature*, vol. 529, no. 7584, p. 92, Jan. 2016, doi: 10.1038/NATURE16483.