

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Receptor-orientált daganatterápia vizsgálata ErbB fehérjéket kifejező
humán tumorokban**

Váradi Tímea Erzsébet

Témavezető: Dr. Nagy Péter



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Receptor-orientált daganatterápia vizsgálata ErbB fehérjéket kifejező
humán tumorokban**

Váradí Tímea Erzsébet

Témavezető: Dr. Nagy Péter



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2012

**Receptor-orientált daganatterápia vizsgálata ErbB fehérjéket kifejező
humán tumorokban**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudomány tudományágban

Írta: Váradi Tímea Erzsébet okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezető: Dr. Nagy Péter, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, Ph.D.
Dr. Hild Gábor, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. június 18. 11 óra,
DE OEC Élettani Intézet Könyvtár

Az értekezés bírálói:

Dr. Dezső Balázs, Ph.D.
Dr. Tóvári József, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi Attila, Ph.D.
Dr. Hild Gábor, Ph.D.
Dr. Dezső Balázs, Ph.D.
Dr. Tóvári József, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. június 18. 13 óra,
DE OEC I.sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. Bevezetés

A rosszindulatú daganatok a halálozási lista élén járnak, ezen belül is az emlőrák a nők körében az egyik leggyakoribb rákfajta. A daganatok hatékony kezelése még napjainkban is nagy problémát jelent a klinikumban. A kevés mellékhatással rendelkező gyógyszerek kifejlesztésének lehetősége az élőlényekből történő anyagok izolálása. Egy ilyen módon előállított anyag az elisidepsin, amelynek teljesen egyedi hatásmechanizmusa van az eddig vizsgált kemoterápiás szerekkel összehasonlítva. Fő célkitűzésünk az volt, hogy a gyógyszer hatását vizsgáljuk az ErbB fehérjék és lipid tutajok eloszlására és szerkezetére, valamint különböző ErbB receptorokat kifejező sejtvonalak elisidepsin érzékenységét hasonlítsuk össze.

Az emlőkarcinómák 20-30%-a fokozott ErbB2 expressziót mutat, ami rossz prognózissal társul. A trastuzumab (Herceptin) volt az első humanizált ErbB2 ellenes monoklonális antitest, amit az előrehaladt állapotú emlődaganatok kezelésére használtak. Azonban a trastuzumab-rezisztencia egy éven belül kialakult és mivel ennek egyik lehetséges oka az ErbB2 trastuzumab kötő epitópjának hialuronsav általi maszkírozása, vizsgálni kívántuk a hialuronsav molekula szerepét az ErbB2 maszkírozásában humán tumormintákon.

A fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata elősegíti a sejtek magasabb szerveződési szintű komplexeinek, szerkezet-függő funkcióinak és ezáltal a jelátviteli folyamatok szabályozásának megértését. Munkám során én is gyakran alkalmaztam a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) módszert, amelyet metszeteken csak korlátozottan lehet használni. Nemrég írták le a proximitás ligációs vizsgálatot (PLA), melyet kiváló jel-zaj aránya miatt nehéz kísérleti körülmények között is ajánlanak, azonban még nem elemezték a módszert kvantitatív szempontból. Ez ösztönzött minket arra, hogy összehasonlítást végezzünk a FRET és a PLA mérési módszerek kvantitatív teljesítményét illetően.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család

Az EGFR transzmembrán receptor tirozinkináz családnak négy tagja ismert: ErbB1 (EGFR/Her1), ErbB2 (Her2/Neu), ErbB3 (Her3) és ErbB4 (Her4). Jelentős szerepet játszanak számos jelátviteli kaszkád beindításában és a daganatok növekedésében. Míg az ErbB1 és az ErbB2 mezenchimális szövetekben is kifejeződik, addig az ErbB3 és az ErbB4 inkább csak az epiteliális sejtekre jellemző. Mutációjuk, sejtfelszíni túlzott kifejeződésük, rákos transzformációhoz vezethet. A molekulacsalád egyes tagjainak viselkedése eltér egymástól, de általánosságban elmondható, hogy stimulálatlan sejtekben is asszociált állapotban helyezkednek el, majd ligand hatására ezen klaszterek átrendeződnek.

2.2. Az ErbB receptorcsalád szignalizációs folyamatai

Az ErbB család tagjai különféle jelátviteli utak aktiválásával változatos sejtválaszokat váltanak ki, úgy mint proliferáció, túlélés, adhézió, migráció és differenciáció.

Az ErbB receptorok ligandjai lehetnek membránba integrált fehérjék, valamint proteolitikus hasítást követően az extracelluláris térben jelenlevő szolubilis molekulák. A ligandokat csoportosítani lehet a receptorokhoz való affinitásuk alapján.

Epidermális növekedési faktor (EGF): az ErbB1 (EGFR) receptor liganduma. Nagy affinitással kötődik a sejtfelszíni ErbB1 receptorokhoz. A receptor a konformációjában történő változás hatására dimerizálódik, és kiváltja a sejtek proliferációját.

Heregulin (HRG, NRG-1): az ErbB3 és az ErbB4 liganduma. Több izoformája is ismert, melyek szerkezetüket tekintve nagyon hasonlóak, de a kötődés affinitása eltérő. Kísérleteim során a nagyobb affinitású HRG- β -t használtam.

2.3. Az ErbB fehérjék szerepe mellrákban, molekuláris daganatterápia

A daganatos sejtek növekedését gyakran a fokozottan kifejezett („overexpresszált”) onkogének befolyásolják, ezért még előrehaladott daganatos betegség esetében is sikeres lehet olyan terápia alkalmazása, amellyel a fokozottan kifejeződő onkoproteint célozzák meg. Ha a beteg daganata ErbB2-pozitív, akkor betegségének rosszabb a prognózisa, mint az ErbB-negatív betegeké, tehát nagyobb a valószínűsége az áttétképződésnek. A klinikumban jelenleg nincs olyan monoterápia, ami önmagában elég hatásos lenne. A hagyományos tumorterápiás eljárások mellett, amelyek aspecifikusak, egyre elterjedtebbek a molekuláris alapú kezelések. Az egyik legfontosabb célmolekula az ErbB2. Az ErbB2 gátlása több módon lehetséges, az egyik a tirozin kináz aktivitásának gátlása kináz inhibitorokkal. Ezen kívül a fehérjét kifejező sejtek specifikus gátlása ErbB2 ellenes monoklonális antitestekkel is lehetséges.

Trastuzumab (Herceptin®): A trastuzumab a 4D5 jelű, ErbB2 ellen egérben termeltetett monoklonális antitest humanizált változata. II-es és III-as klinikai fázisban egyértelműen bebizonyosodott daganatellenes hatása mind monoterápia formájában, mind kemoterápiával kombinálva.

Pertuzumab (Omnitarg®): A pertuzumabot a 2C4 jelű egér monoklonális antitest humanizálásával állították elő. Mivel az ErbB2 II. extracelluláris doménjében a dimerizációért felelős hurokhoz kötődik, ezért sztérikusan gátolja az ErbB2 heterodimerizációját. Előnye, hogy nemcsak megállítja a sejtek növekedését, hanem a tumor méretét is csökkenti, ellentétben a trastuzumabbal.

Az ErbB2 jelentőségét tovább fokozza, hogy nem csak az ErbB család tagjaival, de más molekulákkal is alkothat funkcionális egységet. Többek között a MUC-4, a CD44 és a hialuronsav olyan molekulák, amelyek kapcsolata az ErbB2-vel már dokumentált, ugyanakkor ezek a molekulák önmagukban is szerepet játszanak a tumorok fejlődésében.

2.4. Trastuzumab hatásmechanizmusa

A kedvező klinikai eredmények miatt a trastuzumab széles körben alkalmazott gyógyszer annak ellenére, hogy hatásmechanizmusa ma sem teljesen ismert.

- *in vitro* körülmények között az antitest közvetlen, daganatsejtekre kifejtett hatását feltételezik: a trastuzumab olyan jelátviteli utakat indít el, amelyek egyik eredménye az ErbB2 internalizációjához és down-regulációjához vezet
- *in vivo* alkalmazás esetén indirekt hatás valósulhat meg: az emlőtumor sejtek ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) segítségével pusztulnak el. Ennek során a daganatsejt felszínéhez kötődött antitestet Fc- γ receptorral rendelkező immunkompetens sejtek felismerik és elpusztítják.

Korábban a down-reguláló képességet tartották felelősnek a daganatgátló hatásért, de újabb klinikai vizsgálatok alátámasztják az Fc rész mediálta ADCC fontosságát.

2.5. Trastuzumab rezisztencia

A kedvező klinikai eredmények ellenére sajnos néhány ErbB2-pozitív mellrák elsődlegesen rezisztens (primer rezisztencia) a trastuzumab terápiára, és az esetek nagy részében a rezisztencia egy éven belül kialakul azoknál a betegeknél is, akik kezdetben válaszoltak a terápiára (szekunder vagy szerzett rezisztencia). A rezisztencia kialakulásáért az alábbi mechanizmusok egyaránt felelősek lehetnek ennek:

- különböző alternatív jelátviteli útvonalak aktiválódása
- epitóp maszkírozás (MUC-4, hialuronsav)
- a PTEN (foszfatáz- és tenzinhomológ gén) tumorszuppresszor csökkent expressziója
- elégtelen trastuzumab által kiváltott ADCC reakció

Munkám során a rezisztencia mechanizmusok közül részletesen az ErbB2 hialuronsav általi maszkírozásával foglalkoztam.

2.6. A hialuronsav (HA) szerepe a tumor progresszióban és az ErbB2 maszkírozásában

A hialuronsav egy nagy térkitöltésű, anionos poliszacharid, nagy mennyiségben megtalálható a kötő-, epithelialis és idegszövetekben. Tumorokban megfigyelhető a HA mennyiségének növekedése. A HA közreműködik a sejtnövekedésben és motilitásban, de szintén fontos szerepe van a proliferációban, migrációban, véredényképzésben, multidrog rezisztenciában és az epithelialis-mezenchimális átmenetben. A HA túltermelődése az emlőkarcinómákban meggyorsítja a tumor növekedését a stróma sejtek toborzása miatt, stimulálja a véredényképződést, ami a tumor kedvezőtlen prognózisának indikátora. Az ErbB2 hialuronsav által történő maszkírozása a trastuzumab kötődésének csökkenéséhez és rezisztencia kialakulásához vezethet.

2.7. Az elisidepsin molekuláris hatásmechanizmusa

Mivel sok természetes eredetű anyagnak van farmakológiai és biológiai hatása, ezért ezek olyan új hatóanyagok felfedezésének forrásai, amelyek alkalmazásával kevesebb mellékhatás és nagyobb tumor ellenes hatás érhető el. Egy ilyen anti-tumor anyag a Kahalalide F, amit először egy puhatestűből vontak ki. Mivel ennek izolálása nehézkesnek, ezért ennek egy rokonát szintézissel kezdték el előállítani. Ennek a hatóanyagnak a neve elisidepsin, kereskedelmi neve pedig Irvalec.

Az elisidepsin a daganatos megbetegedések széles spektrumában bizonyult hatásosnak. Egyedi hatásmechanizmussal rendelkezik a National Cancer Institute (NCI) „Compare” analízise alapján. Hatással van többfajta tumor típusra (mell-, vastagbél-, hasnyálmirigy-, tüdő-, prosztaták) és mivel pre-kliniai vizsgálatokban anti-tumor hatása a nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) jelentős, ezért bevezették a fázis II klinikai vizsgálatokba még azelőtt, hogy részletes hatásmechanizmusát feltárták volna.

Bár támadáspontjáról keveset tudunk, megfigyelések szerint a vegyület a lizoszomális membrán felszakadását, sejtmag fragmentációt és nekrotikus sejthalált indukál, melyet intenzív sejtduzzadás kísér. Egy újabb cikk szerint az elisidepsin a tumor-sejtek plazmamembránjára hat, ahol is a lipid kettősréteg átrendeződését váltja ki. FA2H-val (fatty acid 2-hydroxylase) történő transzfekció érzékenyebbé tette a sejteket az elisidepsin iránt. Az FA2H-nak szerepe van a lipid tutajok stabilizációjában, tehát feltételezhetjük, hogy az elisidepsin membránhoz kötődése a lipid tutajokban történik. Ezen kívül indirekt bizonyítékok alapján feltételezték, hogy az ErbB proteinek szerepet játszanak az elisidepsin hatásmechanizmusában.

2.8. Molekuláris asszociációk szerepe és azok vizsgálata

A növekedési faktor receptorok asszociációja a szignalizációs folyamatok első lépése. Számtalan molekuláris és immunológiai vizsgálómódszer áll rendelkezésünkre a sejtfelszíni fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, azonban egyesek jelentős hátránnyal is rendelkeznek. A leggyakrabban használt módszerek az alábbiak:

1. Kvalitatív-szemikvantitatív eljárások:

- hagyományos molekuláris biológiai módszerek („*co-capping*”, *koprecipitáció*, *kémiai keresztkötés*, *Western-blot technika*): értékes információt szolgáltat a fehérjék elhelyezkedéséről, azonban az alkalmazott kivonási és izolálási eljárások eleve megakadályozzák, hogy a fehérjéket a saját környezetükben vizsgáljuk, másrészt ezek a módszerek mesterséges aggregátumok kialakulását is okozhatják.
- élesztő két-hibrid (yeast two-hybrid, *Y2H*) és bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs (*BiFC*) technikák: általánosan használják fehérjekomplexek és interakciójuk kimutatására, hátránya hogy a fragmentálódott transzkripciós faktork vagy fluorofórok rekonstruálása

irreverzibilis. A fenti hátrányok ellenére a Y2H és a hozzá hasonló eljárásokat nagy áteresztőképességű vizsgálatokban (high throughput screening, *HTS*) is alkalmazzák, melyek a korai fázisú gyógyszerkutatás meghatározó módszerévé váltak.

2. Kvantitatív módszerek:

- mikroszkópos kolokalizációs mérések: a kolokalizáció kimutatása nem bizonyít molekuláris kölcsönhatást, csak azt, hogy a két fehérje a mikroszkóp feloldási szintje által meghatározott távolságon belül helyezkedik el egymástól.
- FRET módszer: a FRET egy fluoreszcens donor és egy akceptor molekula közötti dipól-dipól kölcsönhatás révén létrejövő energiaátadás, amely hatékony intra- és intermolekuláris, nanométer léptékű távolságok vizsgálatában. Homo-FRET változatának mérésével a receptor asszociátumok méretét is meg lehet határozni. Kiváló olyan szempontból, hogy élő sejteken alkalmazható anélkül, hogy a sejtek fiziológiás állapotába jelentősen beavatkoznánk.
- FCS módszer: kis térfogatban lejátszódó reakciók egyensúlyának és kinetikájának, molekulák diffúziójának, fotofizikai folyamatoknak, illetve több molekula együttes mozgásának vizsgálatára kifejlesztett technika. Ez a módszer a sejtek molekuláris szintű kölcsönhatásainak szinte egyetlen vagy legalábbis néhány molekulára leszűkíthető vizsgálatát teszi lehetővé.

A proximitás ligációs vizsálat (PLA) egy újabb technika, melynek teljesítőképességét kvantitatív szempontból még nem vizsgálták. A módszer képes protein interakciók vagy modifikációk detektálására és egyedisége abban mutatkozik meg, hogy friss sejteken és fagyasztott metszeteken is alkalmazható a többi módszerrel ellentétben. A módszer azon alapszik, hogy a két vizsgált molekulát olyan antitestekkel jelölik meg, melyekhez DNS oligonukleotidokat

kötöttek. Az oligonukleotidok ún. összekötő („connector”) oligonukleotidok segítségével hibridizálnak egymással (ha molekuláris közelségben vannak egymáshoz), és egy cirkuláris DNS molekula jön létre, amit RCA („rolling circle amplification”) reakcióval felerősítenek. A képződött amplifikált terméket fluoreszcens oligonukleotid hibridizációjával teszik láthatóvá. Az *in situ* PLA módszer lépései: blokkolás, PLA próba kötődése, hibridizáció, ligáció, amplifikáció, detektálás.

2.9. Lipid tutajok szerkezete, biológiai funkciói

A plazmamembránt amfipatikus lipid molekulák kettős rétege alkotja, melybe fehérjemolekulák süllyednek bele. A mikrodomének struktúrája, lipid- és fehérjeösszetétele eltér a környezetétől. A legismertebb mikrodomének a lipid tutajok (raftok), amelyeket többféleképpen lehet definiálni:

- több fizikokémiai tulajdonságuk eltér a környező membránra jellemző paraméterektől. Így sűrűségük alacsonyabb, hideg nemionos detergensben oldhatatlanok. Továbbá a lipid tutajok telített lipidekben, koleszterinben, szfingolipidekben és proteinekben gazdagok.
- a lipid és fehérje komponensek fluoreszcens jelzését követően lehetséges a lipid tutajok közvetlen megfigyelése különböző mikroszkópos és spektroszkópos technikákkal. Így megállapították, hogy a membránban léteznek olyan, 20-200 nm átmérőjű dinamikus struktúrák, melyek nagy valószínűséggel megfelelnek az előző pontban biokémiailag definiált lipid tutajoknak.

A tutajban található membránfehérjék egy speciális osztályát alkotják a glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI-) horgonyzott fehérjék. Ezek a membrán külső lipid rétegéhez kapcsolódnak. A GPI-horgonyzott fehérjék mobilitás szempontjából a lipidekhez hasonlítanak, ugyanis a membránba nem egy transzmembrán fehérje szegmens segítségével, hanem egy lipid molekula által ágyazódnak.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak és plazmidok

Kísérleteinket SKBR-3 (trastuzumab-szenzitív emlőtumor), CHO (kínai hörcsög ovarium) és A431 (epidermoid karcinóma) sejtvonalakon végeztük. Az ErbB2-vel stabilan transzfektált CHO (CHO-ErbB2), valamint az ErbB2-vel és ErbB3-mal transzfektált CHO (CHO-ErbB2-3) sejtvonalatokat az intézetben állították elő korábban. Az A431-erbB1-eGFP, A431-erbB2-mYFP és az A431-erbB3-citrine sejtvonalak stabilan expresszálják az ErbB1-eGFP-t, az ErbB2-mYFP-t és az ErbB3-citrine-t.

3.2. Életképesség vizsgálatok

Az elisidepsin rövidtávú citotoxikus hatását mikrofluorimetriás PI felvétellel vizsgáltuk. A sejteket nagy sűrűségben, 96-lyukú sejttenyésztő edénybe tettük ki és a teljes konfluencia eléréséig hagytuk őket növekedni. Majd PI-t és különböző koncentrációjú elisidepsint tartalmazó friss tápfolyadékot adtunk hozzájuk. A fluoreszcencia intenzitást Victor3 Multilabel Counter plate olvasóval detektáltuk 37°C-on, 531 nm-es gerjesztési és 632 nm-es emissziós hullámhosszon.

A drog hosszútávú hatását az életképességre a sejtek mitokondriális dehidrogenáz aktivitásának mérésével határoztuk meg ELISA reader segítségével. Egy vízben oldódó tetrazolium-só (WST-1) a mitokondriumok aktivitásával arányos mértékű színváltozást mutat. A reakció csak az életképes sejtekben zajlik, így a mért abszorbancia az élő sejtek mennyiségével korrelál. A sejteket ($\sim 7 \times 10^3$ darab) 96-lyukú sejttenyésztő edénybe tettük ki 24 órával a kísérlet megkezdése előtt. A kezelés elisidepsint különböző koncentrációban tartalmazó oldatokkal történt. A WST-1 reagens abszorbanciáját 450 és 620 nm-en mértük, majd kiszámítottuk a relatív sejtszámot és az IC_{50} -t (félhatásos gátló koncentráció: az a koncentráció, ahol a sejtek 50%-a elpusztult).

3.3. Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések

A FRET tulajdonképpen egy sugárzásmentes energiaátadás, ahol a gerjesztett állapotban lévő fluoreszcens molekula (donor), valamint egy megfelelő spektroszkópai paraméterekkel rendelkező molekula (akceptor) között dipól-dipól kölcsönhatás jön létre. Az energiaátadás legfontosabb feltételei:

- a donor és az akceptor közötti távolság 2-10 nm
- a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumának átfedése
- a donor és az akceptor megfelelő relatív orientációja

A FRET-et azért használják kiterjedten a biológiában, mert segítségével a donor és akceptor közötti távolság mérhető, ill. a donor-akceptor távolság megváltozása becsülhető.

A FRET kísérletekhez a sejteket kétszer mostuk PBS-ben, majd kb. 1 millió sejtet 50 μ l PBS-ben szuszpendáltunk fel és ezt követte egy 30 perces jelölés a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk szintén kétszer és 1%-os formaldehid-PBS eleggyel történt a fixálás. A FRET méréseket FacsArray áramlási citométeren végeztük. AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tal jelölt antitesteket használtunk donorként, ill. akceptorként. A donor, FRET és akceptor fluoreszcencia intenzitását rendre a Yellow, FarRed és a Red csatornában mértük. A FRET hatékonyságot sejtenkénti eljárásban értékeltük ki a ReFlex szoftvert alkalmazva. A mérés során detektáljuk a minták intenzitás-értékeit a donor (Yellow), FRET (FarRed) és az akceptor (Red) csatornában. Minden fluoreszcencia intenzitás értéket a jelöletlen sejtek intenzitásával háttér-korrigálunk.

A PLA módszernél főleg a FRET intenzitások (I_{FRET}) kiszámítása volt fontos.

3.4. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A fluoreszcensen jelölt sejtek vizsgálatára Zeiss LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot használtunk. A konfokális képeket 0.5 μm -es optikai szeletekről vettük fel 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel, $63\times$ (NA=1,4) nagyítású olajimmerziós objektívet használva. A fluoreszcens festékeket és GFP variánsokat argon-ion lézer segítségével gerjesztettük.

3.5. Fluoreszcencia anizotrópia és generalizált polarizáció mérések

A feltripszinezett sejteket $10^7/\text{ml}$ -es koncentrációban Hank's pufferben jelöltük 2 μM TMA-DPH vagy 2.5 μM Laurdan oldattal szobahőmérsékleten, 20 percig. A mintákat $10^6/\text{ml}$ koncentrációra hígítottuk és a méréseket Fluorolog-3 spectrofluoriméteren végeztük. TMA-DPH gerjesztése 352 nm-en történt, az emissziót pedig 430 nm-en mértük. A lipid molekulák a lipid kettősrétegben elsősorban oldalirányú és forgó mozgást végeznek; az anizotrópia a TMA-DPH festék rotációs mozgását jellemzi, és a membránfluiditással fordítottan arányos. Tehát a kisebb r anizotrópia értékek nagyobb membránfluiditást jelentenek.

A membrán különböző fázisú doménjeinek megoszlását Laurdan segítségével vizsgáltuk, ugyanis ez egy olyan membránba ékelődő fluoreszcens festék, amelynek emissziós spektrumát a membrán aktuális hidratáltsági szintje befolyásolja. A Laurdan indikátort 350 nm-en gerjesztettük és emisszióját a kék tartományban, 435 nm-en és spektrumának vörös szélén, 500 nm-en detektáltuk. A generalizált polarizáció (GP) értéket a vörös és kék spektrális részeinek aránya határozza meg. Magas membrán rendezettség alacsony lipid és Laurdan hidratációval jár, ami csökkenti a vízmolekulák által a Laurdan spektrumában létrehozott vörös eltolódás mértékét. Tehát ebben az esetben a kék intenzitás értéke nő a vöröshöz képest, ami a GP növekedését eredményezi.

3.6. Páciensek, humán metszet minták

ErbB2 overexpressziót mutató emlőtumoros betegeket vontunk be a vizsgálatokba. A mintavétel a műtétek során eltávolított szervrészletből történik, még steril körülmények között. Az immunhisztokémiához 4B5 nyúl ErbB2-ellenes monoklonális antitestet használtak. Az ErbB2 amplifikációt FISH módszerrel határozták meg. Csak azok a betegek kerültek be a vizsgálatokba, akik erős pozitivitást (2+ vagy 3+) mutattak mindkét teszt során. A klinikai adatok összegyűjtése a betegek utánkövetése során történik. 45 páciens mintáját jelöltük meg. ~15 képet vettünk fel és analizáltunk mindegyik egyén mintájáról.

3.7. Metszetek jelölése és azok vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A mintákat fixáltuk, majd mostuk PBS-sel. Ezt követően egy kétlépéses blokkolás következett, először BSA-t tartalmazó blokkoló pufferrel, majd a mintákat inkubáltuk jelöletlen avidinnel és biotinnal a fluoreszcens avidin nem specifikus jelölődéséből származó háttér kiküszöbölése miatt. Mosás után a mintákat az elsődleges antitest-keverékek jelenlétében inkubáltuk egy éjen át, amely a következőket tartalmazta: OP15 (az ErbB2 intracelluláris epitópja elleni antitest), AlexaFluor546-trastuzumab és bHABC (hyaluronic acid binding complex). A minták másodlagos jelöléséhez a következő antitesteket alkalmaztuk: AlexaFluor488-streptavidin és AlexaFluor647-GAMIG. Ezzel az antitest keverékkel egy órán át inkubáltuk a mintákat, majd ismét mostuk őket és 1%-os formaldehides-PBS eleggyel fixáltuk.

A felvételeket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal készítettük 60× nagyítású (NA=1,35) olajimmerziós objektívvel. AlexaFluor488, AlexaFluor546 and AlexaFluor647 fluoreszcens festékeket 488, 543 és 633 nm-es lézervonalak segítségével gerjesztettük.

A képanalízis Matlab programkörnyezetben, általunk írt kiértékelő program felhasználásával történt. Minden képre kiszámoltuk az átlagos HABC fluoreszcencia intenzitást (hialuronsav sűrűség) és a pixelenkénti trastuzumab/OP15 hányados átlagát. A mintákat három csoportra osztottuk a HA mennyiségének (alacsony, közepes és magas) függvényében, és azok trastuzumab/OP15 arányát hasonlítottuk össze.

3.8. Oligonukleotiddal jelölt antitestek (proximitás próbák) készítése

Az elsődleges antitestekből 200 µg-ot 4 mg/ml koncentrációban PBS-ben jelöltünk 2 órán át feleslegben jelen lévő SANH (succinimidyl 4-hydrazinonicotinate acetone hydrazone) jelenlétében szobahőmérsékleten. Az antitesteken jelen lévő amino csoportokból az SANH hatására reaktív hidrazinopiridin csoportok keletkeznek, amik aldehid módosított oligonukleotidokkal konjugálhatók. A reakciót az aldehid módosított „priming” és „non-priming” oligonukleotidok 3,5×-es moláris feleslegének jelenlétében 3 órán keresztül végeztük szobahőmérsékleten. A kiválogatott frakciók koncentrációját gél elektroforézissel becsültük meg és az oligonukleotid-konjugált elsődleges antitestek kötődését immunfluoreszcens eljárással vizsgáltuk.

3.9. Sejtek jelölése „in situ” PLA vizsgálatokhoz

A feltripszinezett sejteket 10^6 /ml-es koncentrációban mostuk hideg PBS-ben, majd a mintákat 1%-os formaldehides-PBS eleggyel fixáltuk 10 percen át. Mosást követően a sejteket 30 percig inkubáltuk blokkoló pufferben 37°C-on. Centrifugálás után a blokkoló puffert eltávolítottuk és a sejteket oligonukleotiddal jelölt proximitás próbákkal és fluoreszcens antitestekkel jelöltük 10-20 µg/ml-es koncentrációban 1-2 órán keresztül. A nem kötött proximitás próbákat eltávolítottuk, majd inkubáltuk őket összekötő oligonukleotiddal 15 percig. Majd

TBST-vel mostuk a mintákat és inkubáltuk 15 percig Duolink „Ligation” oldattal 37°C-on, ezt követően mosás következett és inkubálás Duolink „Amplification” oldattal 60 percig szintén 37°C-on. Mindezek után ismét mostuk a mintákat és az RCA reakciótermék vizualizálásához hozzáadtunk 25 nM Cy5-jelölt detektor oligonucleotidot, amit detektáló pufferben oldottunk. Végezetül mostuk a sejteket TBST-vel és 1% formaldehiddel fixáltuk.

3.10. PLA mérések és kiértékelésük

FACSCalibur áramlási citométert használtunk a proximitás próbával és a fluorofórral jelölt antitesttel jelölt sejtek analízisére. A készülék két lézerrel van felszerelve. Az oligonukleotid Cy5 jelét használtuk a PLA detektálására, amit 635 nm-en gerjesztettünk és az FL4 csatornában mértünk 661/16 nm sávszűrőt használva. Az AlexaFluor488 festékkel jelölt antitest fluoreszcenciáját 488 nm-en gerjesztettük és az FL1 csatornában detektáltuk 530/30 nm sávszűrő alkalmazásával. Mintánként 20.000 sejtet vettünk fel és elemeztünk a ReFlex szoftver segítségével.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata

4.1.1. Az ErbB1-3 expresszió nem befolyásolja a CHO és az A431 sejtek elisidepsin iránti érzékenységét

Korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy az ErbB fehérjék központi szerepet játszanak az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában. Mivel az idézett irodalmi forrásokban az ErbB expresszió és az elisidepsin érzékenység közti korreláció viszonylag gyenge volt, célul tűztük ki, hogy ellenőrizzük a két paraméter közötti összefüggést. Ezért két stabilan transzfektált sejtvonalat hoztunk létre, az ErbB2 fehérjét expresszáló CHO-ErbB2-t és mind az ErbB2-t, mind ErbB3-at expresszáló CHO-ErbB2-3 sejtvonalat.

Hogy felfedjük az elisidepsin hosszútávú hatását az eredeti CHO sejtvonal és az ebből származtatott, fentebb említett sejtvonalak életképességére, különböző koncentrációjú elisidepsinnel kezeltük őket 2 órán keresztül és mosást követően tovább hagytuk nőni még 3 napig. A sejtszámmal arányos normalizált abszorbancia értékeket az elisidepsin koncentráció függvényében ábrázoltuk, és a mérési pontokból kiszámítottuk az IC_{50} értékeket. A három sejtvonal között nem találtunk különbséget az elisidepsin érzékenység szempontjából (IC_{50} -CHO: $10,0 \pm 0,7 \mu M$; IC_{50} -CHO-ErbB2: $10,5 \pm 0,9 \mu M$; IC_{50} -CHO-ErbB2-3: $10,3 \pm 0,8 \mu M$).

Az elisidepsin rövidtávú hatásának vizsgálatához és a drog-indukálta sejthalálozás időfüggésének felfedéséhez a vizsgált három sejtvonalat különböző elisidepsin koncentrációkkal kezeltük, és a PI felvételt mikrofluorimetria segítségével követtük 1 órán át. A drog által kiváltott membrán permeabilizáció mértéke és kinetikája összehasonlítható volt mindhárom sejtvonal esetében, mivel a fluoreszcencia intenzitás nem mutatott jelentős különbséget a variancia analízis során ($p > 0.1$). Tehát sem az ErbB2, sem az ErbB3 fehérjék expressziója nem

befolyásolja a CHO sejtek elisidepsin iránti érzékenységet akár a rövidtávú, akár a hosszútávú hatás szempontjából.

Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az ErbB fehérjék hatásának hiánya nem valami CHO-ra specifikus jelenség, vizsgálni kezdtük a rövid- és hosszútávú hatásokat A431 sejteken és ennek különböző ErbB proteinekkal (ErbB1-eGFP, ErbB2-mYFP, ErbB3-citrine) transzfektált származékain (A4erbB1, A4erbB2 és A4erbB3 sejtek). Hasonlóan a CHO sejtekhez, az ErbB proteinek (ErbB1-3) jelenléte az A431 sejtekben nem változtatta meg sem a hosszútávú, sem a rövidtávú hatásokat, ugyanis ezek vizsgálatokor nem találtunk szignifikáns eltérést a négy sejtvonal között (IC_{50} -A431: $8,2 \pm 0,8 \mu M$; IC_{50} -A4erbB1: $9,4 \pm 0,5 \mu M$; IC_{50} -A4erbB2: $9,9 \pm 1,0 \mu M$; IC_{50} -A4erbB3: $9,9 \pm 0,9 \mu M$). Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy az elisidepsin által indukált citotoxikus hatás egy gyors folyamat és az ErbB1, ErbB2 és ErbB3 proteinek kifejeződése nem befolyásolja a sejtek drog iránti érzékenységét.

Korábbi beszámolókból leírták, hogy az ErbB3 vagy az ErbB1-3 fehérjék kulcsfontosságú faktorok a Kahalalide F és az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában. Saját kísérleteinkben a CHO és az A431 sejtvonalak elisidepsin-érzékenysége nem korrelált az ErbB proteinek expressziós szintjével, ezért megkérdőjelezhető, hogy van-e döntő szerepe az ErbB receptoroknak az elisidepsin iránti szenzitivitás meghatározásában. Különösen az a felismerés, hogy sem az ErbB2, sem az ErbB2 és ErbB3 kifejeződése vad típusú CHO sejtekben nem változtatta meg az érzékenység mértékét, egyértelművé tette, hogy az ErbB2 és ErbB3 fehérjék nem vesznek részt a mechanizmusban.

4.1.2. Az elisidepsin csökkentette az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációját

Egy fehérje direkt vagy indirekt közreműködését egy drog hatásában gyakran az adott fehérje megváltozott asszociációs állapotával tudjuk jellemezni. Mivel az előbb említett kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az ErbB3 konformációja valószínűleg módosult elisidepsin kezelés hatására, ezért vizsgálni kívántuk, hogy vajon az ErbB2 és ErbB3 homo- és heteroasszociációja hogyan változik a kezelést követően. Áramlási citometriás FRET méréseink mutatják, hogy az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjában szignifikáns csökkenés jelentkezett elisidepsin kezelés során, míg ezen fehérjék heteroasszociációja nem változott jelentősen.

Mind az ErbB2, mind az ErbB3 nagyméretű asszociátumokat képez, melyek több tíz proteint is tartalmaznak aktiválatlan sejtek esetében. Feltételezésünk szerint a nagy fehérje klaszterek az elisidepsin által indukált membrán módosulások eredményeképpen szakadnak szét, és ez eredményezheti az ErbB2 és ErbB3 homoasszociáció csökkenését. Ezen feltételezést alátámasztja azt, hogy a membrán-közvetített kölcsönhatások alapvető szerepet játszanak a nagy protein aggregátumot kialakulásában. Feltételezzük, hogy az ErbB2 és ErbB3 molekulák heteroklaszterei sokkal kisebb méretűek, mint ezen molekulák homoasszociátuma, ezért az elisidepsin lipid membránra gyakorolt hatásai nem befolyásolják őket.

4.1.3. Az elisidepsin megváltoztatta az ErbB3 és a lipid tutaj fehérjék (GPI-horgonyzott GFP) eloszlását

A FRET mérések szenzitívek a fehérjék egymás közötti kölcsönhatásának kimutatásában, de a molekulák eloszlásáról és azok klaszterbe rendeződéséről mikrométeres skálán nem adnak felvilágosítást. Ezért ahhoz, hogy a drog hatását vizsgáljuk a fentebb említett dimenziókban, kontroll és elisidepsin-kezelt CHO-ErbB2-3 sejteket jelöltünk fluoreszcens ErbB2 és ErbB3 ellenes antitestekkel. A konfokális mikroszkóppal felvett képek meggyőzően mutatják, hogy az elisidepsin

nem módosította az ErbB2 elrendeződését, míg az ErbB3 eloszlását szignifikánsan megváltoztatta. Ez abban nyilvánult meg, hogy a fehérje a plazmamembránból az intracelluláris térbe transzlokálódott, ahol részben diffúz eloszlást mutatott. Az elisidepsin szelektív hatásának megerősítésére ErbB1-3 fehérjék fluoreszcens proteinnel fuzionált változatával transzfektált A431 sejteket is megvizsgáltunk. Míg az elisidepsin (10 μ M) nem volt hatással az ErbB1 és ErbB2 tipikus membrán lokalizációjára, addig az ErbB3 intracellulárisan felhalmozódott a kezelés hatására, ami gyakran mutatott intracelluláris vezikulákra jellemző eloszlást.

Mivel valószínűleg a lipid tutajoknak is szerepe van az elisidepsin hatásmechanizmusában, megvizsgáltuk az elisidepsin hatását több lipid tutajban található fehérje eloszlására. Ismert, hogy a GPI-horgony a lipid tutajokba lokalizálja a fehérjéket, ezért először GPI horgonyzott eGFP-fel tranziensen transzfektált A431 sejteken vizsgáltuk az elisidepsin hatását. Kezeletlen sejtekben a GPI-eGFP jelent volt mind a plazmamembránban, mind az intracelluláris vezikulumokban, de elisidepsin hatására szinte teljes egészében intracelluláris vezikulumban halmozódott fel.

Feltételezzük, hogy a hatóanyag által kiváltott membránhatások (amelyek magukba foglalják a lipid tutajokat is) vezetnek a lipid tutaj asszociált membránproteinek specifikus átrendeződéséhez.

4.1.4. Az elisidepsin a plazmamembrán rendezettségében okoz változást

Az a megfigyelés, hogy az elisidepsin hatással van az ErbB fehérjék kölcsönhatására, ellentmondásban van azzal, hogy az ErbB proteinek expressziója nem befolyásolja a drog iránti érzékenységüket. Megkíséreltük ezt az ellentmondást feloldani azzal, hogy feltételeztük, hogy az elisidepsin által az ErbB fehérjék eloszlásában indukált változások egy korábban jelentkező

membránátrendeződés következményei. Ennek ellenőrzésére kétféle fluoreszcens próbát használtunk. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája (r) a membrán mikroviszkozitásának érzékeny indikátora, mivel pozitív töltése miatt nem tud átmenni a sejtmembránon. A431 sejtek kezelése 10 μ M elisidepsinnel egy majdnem azonnali csökkenést idézett elő a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájában, ami megnövekedett membrán fluiditást jelent. A Laurdan generalizált polarizációja (GP) érzékeny a plazmamembrán rendezettségére és a vízmolekulák membránba való penetrációjának mértékére. A GP a kezelést követően 1 percen belül megnövekedett, majd fokozatosan csökkent, ami a plazmamembrán rendezettségének növekedésére és a víz penetrációjának csökkenésére utal.

Az r csökkenésének és a GP növekedésének kombinációja arra utal, hogy olyan membrán domének indukálódtak, melyekben kicsi a molekulák hidratáltsági szintje, de viszonylag nagy a mobilitása. Ez a rendezett folyékony doménekre jellemző, amelyek a lipid tutajok megfelelői. Feltételezzük, hogy a membrán szerkezetében beálló ezen jelentős változásokat követi a membrán permeabilizáció és a sejt pusztulása.

Ahhoz hogy bebizonyítsuk, hogy az elisidepsin által megfigyelt membránváltozások nem csak az A431 sejtek esetében jelentkeznek, kísérleteinket SKBR-3 sejtvonalon is megismételtük. Az SKBR-3 sejteken indukált változások tendenciája nagy hasonlóságot mutatott az A431 sejteknél tapasztaltakhoz.

A lipid kettősréteg rendezettségében és fluiditásában tapasztalt gyors változások alátámasztják, hogy a drog elsődleges támadáspontja a plazmamembrán és az ErbB- és GPI-horgonyzott proteinek eloszlása és asszociációja a sejtmembránon kiváltott strukturális változásoknak a következménye.

4.2. Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban

4.2.1. A páciensekben a trastuzumab kötődését a magas hialuronsav képződés meggátolja

Kifejlesztettünk egy módszert a trastuzumab kötődésének kvantitatív meghatározásra, amit a humán emlődaganatos minták ErbB2 expressziójára normáltunk. A metszeteket háromszorosán jelöltük: a HA expressziót HABC jelöléssel mértük, az ErbB2 kvantitatív meghatározásához egy olyan monoklonális antitestet használtunk, ami az ErbB2 intracelluláris epitópját ismeri fel (mAb OP15), míg a harmadik fluoreszcens antitest a trastuzumab volt. Azonosítottuk a sejtmembránt és a trastuzumab intenzitását normáltuk az ErbB2 expressziós szintjére. A fluoreszcencia intenzitásokat csak a membrán pixelek által alkotott maszkhoz tartozó területen határoztuk meg.

A normalizált trastuzumab kötődés jelentős negatív korrelációt mutatott a HA mennyiségével. A korrelációs koefficiens $-0,52$ volt. Ez az érték szignifikánsan eltér nullától, és egy közepesen erős kapcsolatra utal a két változó között. A korrelációs koefficiens négyzete $0,27$, ami arra utal, hogy közelítőleg a normalizált trastuzumab kötődés variációjának negyedéért a HA sűrűségének változása a felelős. A mintákat három csoportra osztottuk (alacsony, közepes és magas HA sűrűség). A variancia analízis alapján ($p < 0,001$) a trastuzumab kötődése kétszer magasabb volt az alacsony HA mennyiségnél, mint a magasnál. Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a sejtek körüli HA meggátolja a trastuzumab kötődését az ErbB2 receptorhoz.

4.2.2. Nem a FRET okozza a trastuzumab kötődés és a hialuronsav sűrűsége közötti negatív korrelációt

Számos faktor generálhatja a negatív korrelációt a két fluoreszcens próba kötődése között. Az A488-kapcsolt HABC A546-trastuzumab általi FRET-indukált kioltása vagy az A546-trastuzumab kioltása A647 jelölt OP15 által is vezethet a HABC fluoreszcencia intenzitás csökkenéséhez vagy a trastuzumab/OP15 intenzitás arány csökkenéséhez. Ha a fenti faktorok hatással lennének a negatív korrelációra, akkor a trastuzumab és OP15 antitestek fluoreszcens festékeinek felcserélése a korreláció megváltozásához vezetne. Ezért kiválasztottunk egy-egy mintát az alacsony, közepes és magas HA mutató csoportokból és összehasonlítottuk azok trastuzumab/ErbB2 arányait, amikor megjelöltük őket A546-trastuzumab és A647-OP15 antitestekkel (“normál” jelölés), valamint A546-OP15 és A647-trastuzumab antitestekkel (“fordított” jelölés). Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a trastuzumab/ErbB2 arányok tendenciájában a kétféle jelölés során. Továbbá, megmértük az A546-trastuzumab és A647-OP15 antitestek közötti FRET-et áramlási citométerrel SKBR-3 emlő tumor sejteken. A FRET szinte teljes hiányát figyeltük meg a két epitóp között (az egyik az ErbB2 intracelluláris, a másik az extracelluláris része), tehát a FRET jelenségnek nincs hatása a normalizált trastuzumab kötődésre.

4.2.3. A trastuzumab kötődés és a hialuronsav sűrűség közötti negatív korreláció tipikusan jelen van egyedi minták esetében is

A fentebb említett megfigyelést, miszerint az alacsony trastuzumab kötődés a magas HA tartalomnak köszönhető, egyedi minták alapján is bizonyítottuk. Vizsgáltuk a korrelációt a kétdimenziós hisztogramok ellenőrzésével, ahol a normalizált trastuzumab kötődést ábrázoltuk a HA sűrűség függvényében. A negatív korreláció a minták $\sim 2/3$ -ánál megfigyelhető volt. A hatás nagysága

szignifikánsan alacsonyabb volt, mint páciensenként, a korrelációs koefficiens is alacsonyabbnak mutatkozott ($r = -0.3$) és csak ~ 1.5 -szeres különbség volt a normalizált trastuzumab kötődésben az alacsony és a magas HA sűrűségeknél (szemben a betegenként számolt adatoknál kapott ~ 2.5 -szeres különbséggel). Ezen adatok mégis megerősítik, hogy a sejt körüli HA megakadályozza a trastuzumab ErbB2-höz történő kötődését.

4.3. A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata

4.3.1. Kezdeti észrevételek a FRET és a PLA közötti korreláció hiányáról

Mivel szövetekben a FRET mérések kivitelezése nehézségekbe ütközik, a PLA módszer értékes alternatívát kínál ilyen esetekben. A módszer kidolgozói annak kvantitatív jellege mellett érveltek. Ezért célul tűztük ki a FRET és PLA módszerek összehasonlítását. Az első ilyen rendszer az ErbB1 receptor homodimerizációjának EGF indukálta növekedése volt. Míg az ErbB1 homoklaszterek növekedése a várakozással összhangban szignifikáns volt EGF kezelés után áramlási citometriás FRET mérések alapján, addig a PLA esetében nem tapasztaltunk változást a receptorok homoasszociációjában. Ezt követően a FRET és a PLA eredmények korrelációját az ErbB2 molekulán végrehajtott inter- és intramolekuláris mérések során vizsgáltuk. A sejteket megjelöltük olyan donor- és akceptor-konjugált ErbB2 ellenes antitestekkel, amelyek az ErbB2 különböző epitópjai ellen termeltettek, és mértük az intramolekuláris FRET-et. Majd az ErbB2 homoasszociációjának mérése céljából a sejteket az ErbB2 ugyanazon epitópja elleni, donor-konjugált és akceptor-konjugált anti-ErbB2 antitestek keverékével jelöltük meg. A fenti inter- és intramolekuláris távolságok PLA-val történő mérése céljából ugyanazon epitópokat jelöltük meg oligonukleotiddal jelölt PLA próbákkal. A FRET és PLA között nem tapasztaltunk korrelációt. Fel kellett tételeznünk, hogy a PLA módszer ebben a tekintetben jelentősen elmarad a FRET mögött.

4.3.2. A FRET és a PLA különböző függése a fehérje expressziós szinttől az ErbB2 homoasszociációjának mérésekor

A két módszer szisztematikus összehasonlítását a homoasszociáció expressziós szinttől való függésének elemzésével kezdtük. Összehasonlítottuk a FRET és a PLA mértékének függését a fluorofór-kapcsolt és az oligonukleotid-konjugált antitestek mennyiségétől. SKBR-3 sejteket jelöltünk trastuzumab-„priming” és trastuzumab-„non-priming” antitestek keverékével. Ugyanazon sejteket ErbB2 ellenes fluoreszcens antitesttel is jelöltük a fehérje expresszió mértékének méréséhez. A PLA jel telítésbe futott. A tény, hogy a PLA szignál telítődése a fluoreszcencia intenzitás eloszlás középső részén van (vagyis körülbelül az átlag fluoreszcencia intenzitásnál), utal arra, hogy a telítési effektus a PLA kísérleteknél a tumor sejteknél gyakran megfigyelhető magas expressziós szinteknél bekövetkezik.

A PLA jel telítési effektusának kísérletes igazolása után ugyanazon biológiai rendszeren ellenőriztük, hogy a FRET jel mutat-e hasonló tendenciát. Mivel a FRET intenzitás függ mind a fluorofór-jelölt antitestek mennyiségétől (I_d), mind azok közelségétől (E), így analóg a PLA jellel, amelynél szintén várható, hogy a fehérjék proximitásától és mennyiségétől egyaránt függ. A PLA jellel ellentétben sem a FRET intenzitás, sem a FRET határfok nem mutatott telítési effektust. A tény, hogy a FRET intenzitás és a PLA jel különbözőképpen függött a vizsgált proteinek expressziós szintjétől, azt sugallja, hogy ez a két módszer jelentősen különböző információt szolgáltat a fehérje asszociációkról.

4.3.3. A FRET és a PLA különböző függése az expressziós szinttől intramolekuláris mérések esetében

Mivel az intramolekuláris távolságok függetlenek az expressziós szinttől, egy molekula két epitópjának proximitása megbízható referenciaként használható a

PLA és a FRET mérések összehasonlítására. Ezért megvizsgáltuk két ErbB2 ellenes antitest (pertuzumab és trastuzumab) epitópja közötti közelséget a két módszerrel. Hasonlóan a fentebb leírt intermolekuláris mérésekhez, az intramolekuláris PLA is telítődést mutatott. A PLA eredményekkel ellentétben, a FRET intenzitás erős lineáris korrelációt mutatott az expressziós szinttel, míg a FRET hatásfok állandó volt minden kifejeződési szinten. Elmondhatjuk, hogy PLA-nál a szaturáció jelensége mind intra-, mind intermolekuláris mérések esetében is megnyilvánul, míg FRET esetében telítődési effektust nem tapasztaltunk.

4.3.4. Az antitestek sűrűsége nagyban befolyásolja a FRET és PLA méréseket

Az előző pontokban ismertetett kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a PLA esetében tapasztalt szaturáció az oligonuklotiddal jelölt proximitási próbák denzitástól függően alakul ki. Ezért egy olyan kísérleti elrendezést terveztük, amiben a proximitási próbák sejtfelszíni mennyiségét ellenőrzött módon be tudjuk állítani. Egy olyan mintasorozatot állítottuk elő, amelyben a mintákat három antitest (trastuzumab-„priming”, AlexaFluor488-trastuzumab, pertuzumab-„non-priming”) keverékével jelöltük meg. Minden mintához ugyanolyan koncentrációjú pertuzumab-„non-priming” antitestet adtunk, de a trastuzumab-„priming” és AlexaFluor488-trastuzumab antitestek arányát mintánként változtattuk 100%-ról 10%-ra. A sejthez kötődött trastuzumab-„priming” antitest mennyiségét az AlexaFluor488-trastuzumab fluoreszcencia intenzitásból számítottuk ki. Ezt követően elvégeztük az ezzel analóg kísérletet FRET esetében is. Itt is készítettünk egy olyan mintasorozatot, amelyben a donorral jelölt trastuzumab mennyisége állandó volt, de az akceptorral jelölt pertuzumab egy részét leszorítottuk jelöletlen pertuzumab hozzáadásával. A jelöletlen és akceptorral jelölt pertuzumab arányát mintáról mintára változtattuk. A FRET hatásfok az elméletileg megjósolt szigorú

lineáris összefüggést mutatta, míg a PLA esetében a már korábban említett telítési effektust tapasztaltuk. Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy a szaturáció jelensége csak a PLA mérések esetében mutatkozott.

4.3.5. A PLA telítődési jelenségét az RCA reakció időtartama nem befolyásolja szignifikánsan

A PLA mérések során konzekvensen megjelenő telítési effektusnak számtalan oka lehet. Az egyik lehetséges pont, ahol ez a nem-lineáris effektus bekövetkezik az amplifikációs RCA reakció. Ezért megvizsgáltuk, hogy a szaturációs effektus kapcsolatban van-e a nukleozid-trifoszfát szubsztrát depléciójával az RCA reakció során. Ezért összehasonlítottuk a PLA jel expressziós szinttől való függését három különböző inkubációs időt (30, 90 és 150 perc) alkalmazva. A PLA jel növekedett az inkubációs idővel, de a növekedés nem volt lineáris. Bár a szaturáció foka folyamatosan növekedett az inkubációs idővel, már a legrövidebb inkubációs időnél is nyilvánvaló volt. Tehát úgy tűnik, hogy a szubsztrát fogyása a PLA amplifikációs folyamata során nem az egyetlen oka a telítési jelenségnek.

Összefoglalásként elmondható, hogy bár a PLA előnyösen alkalmazható protein interakciók, poszt-transzlációs módosítások detektálására szöveti mintákon, tisztábban kell lennünk a módszer korlátaival. A PLA rendkívül jó jel/háttér arányát ugyanaz az amplifikációs reakció okozza, mint ami valószínűleg felelős a nem-lineáris telítési effektus megjelenéséért. Bár a módszer kidolgozói szerint a PLA, hasonlóan a FRET-hez, „molekuláris vonalzóként” használható a proximitási próba méretének variálásával, a módszer nem bizonyult eléggé kvantitatívnak. Következtetésünk szerint a PLA csak egy szemi-kvantitatív módszer a protein asszociációk mérésére.

5. Összefoglalás

5.1. Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata

Mivel az elisidepsin hatásmechanizmusa nagyrészt ismeretlen volt, ezért vizsgálni kezdtük a drog által kiváltott hatásokat az ErbB receptorokra és a plazmamembránra. A CHO és A431 sejteken és azok származékain végzett rövidtávú és hosszútávú életképesség vizsgálatok azt bizonyították, hogy sem az ErbB2, sem az ErbB3 fehérjék expressziója nem befolyásolja a sejtek elisidepsin iránti érzékenységet, ugyanis a különböző ErbB expressziós szinttel rendelkező sejtvonalak összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns eltérést az IC₅₀ értékek között. Áramlási citometriás FRET méréseink azt mutatták, hogy az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjában szignifikáns csökkenés jelentkezett elisidepsin kezelés során, de a heteroasszociációkra nem volt hatása. A konfokális mikroszkóppal felvett képek meggyőzően mutatták, hogy az elisidepsin nem módosította az ErbB1 és ErbB2 elrendeződését, de szelektíven indukálta a GPI-horgonyzott és az ErbB3 proteinek plazmamembránból intracelluláris vezikulumokba történő átrendeződését. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia és a Laurdan generalizált polarizációjában okozott változások a drog által a plazmamembrán rendezettségében és fluiditásában okozott változásokra utalnak. Az elisidepsin ezen hatásait nagyon gyorsan kifejti. Valószínűleg a hatóanyag elsődleges támadáspontja a lipid kettősréteg és a többi feltárt változás az elsődleges hatás következménye.

5.2. Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban

Az ErbB2 fehérje az emlőtumor kezelésben egy fontos terápiás célpont. A trastuzumab (ErbB2 ellenes antitest) kombinációja kemoterápiával egy hatékony kezelési mód, de a rezisztencia kialakulásának problémája még mindig nagy

kihívást jelent. Az egyik lehetséges ok a hialuronsav mennyiségének növekedése lehet, ezért munkánk során az ErbB2 expressziót mutató emlőtumor szövetekben vizsgáltuk a trastuzumab kötődés és a helyi HA mennyiség közötti korrelációt. Az antikorreláció bizonyítását kvantitatív kép analízissel értük el, úgy hogy a fluoreszcencia intenzitásokat csak a sejtmembránban értékeltük. Azt találtuk, hogy a normalizált trastuzumab kötődés negatív korrelációt mutat a sejt körüli HA sűrűséggel. A HA okozta trastuzumab kötődés gátlásának mechanizmusa ismeretlen annak ellenére, hogy kézenfekvő feltételezések vannak. Valószínűnek tartjuk, hogy a sűrű HA befedi vagy maszkírozza az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját. Az állat modellekben kapott korábbi eredmények, miszerint a HA mennyiségének csökkentésének jó hatása volt a daganatok kezelésében arra utal, hogy a HA egy fontos faktor, ami a tumorokban a hatóanyag hozzáférését limitálja a kötőhelyéhez. Habár a HA nem az egyetlen faktor, amely a trastuzumab rezisztenciához vezethet, eredményeinknek mégis fontos klinikai jelentősége van.

5.3. A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata

A fehérje kölcsönhatások kimutatására nemrég kifejlesztett eljárás a PLA, amely nehéz kísérleti körülmények között (pl. szöveti metszeteken) is alkalmazható. Bár a módszer kiváló jel/háttér arányához nem fér kétség, még nem elemezték részletesen, hogy mennyire tekinthető kvantitatívnak. A módszer a hosszadalmas jelölési protokoll ellenére vonzónak bizonyult a molekuláris biológiai vagy szövetfestési eljárásokban jártas laborok számára. Azonban kezdeti eredményeink arra utaltak, hogy a PLA eredmények nem mindig korrelálnak a FRET kísérletek eredményeivel, pl. PLA-val nem sikerült sem nekünk, sem másoknak EGF hatására az ErbB1 receptor homoasszociáció növekedését kimutatni. Ezért szisztematikusan elemeztük, hogy a PLA jel mennyire korrelál a protein asszociáció mértékével. Demonstráltuk, hogy a PLA jel mind intra-, mind

intermolekuláris proximitási vizsgálatok esetén telítési effektust mutat, tehát a protein asszociációk egy bizonyos mértéke felett a jel nem nő tovább. Az oligonukleotiddal jelölt proximitási próbák denzitását jelöletlen antitesttel csökkentettük, és ebben a rendszerben is azt tapasztaltuk, hogy a PLA jel telítésbe fut a proximitási próbák nagy denzitása esetén. Ezen mérésekkel párhuzamosan mindig elvégeztük az analóg FRET kísérletet is, ahol is a FRET jel mindig lineárisan korrelált a protein asszociációval, ill. a fluorofórral jelölt antitestek denzitásával. Bár a PLA esetében tapasztalható telítési effektus okát nem tudjuk, valószínűnek tartjuk, hogy a jelölési protokoll amplifikációs lépése során történnek azok a nem-lineáris hatások, amelyek a telítés megjelenéséhez vezetnek. Ezért következtetésünk szerint a PLA szemikvantitatív eljárásnak tekinthető.



TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024.

6. Közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /131/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Váradi Tímea

Neptun kód: E3LY9G

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Váradi, T.**, Mersich, T., Auvinen, P., Tammi, R., Tammi, M., Salamon, F., Besznyák jr., I., Jakab, F., Baranyai, Z., Szöllősi, J., Nagy, P.: Binding of trastuzumab to ErbB2 is inhibited by a high pericellular density of hyaluronan.
J. Histochem. Cytochem. "accepted by publisher", 2012.
IF:2.381 (2010)
2. Mocanu, M., **Váradi, T.**, Szöllősi, J., Nagy, P.: Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA).
Proteomics. 11 (10), 2063-2070, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100028>
IF:4.815 (2010)
3. **Váradi, T.**, Roszik, J., Lisboa, D., Vereb jr., G., Molina-Guijarro, J.M., Galmarini, C.M., Szöllősi, J., Nagy, P.: ErbB protein modifications are secondary to severe cell membrane alterations induced by elisidepsin treatment.
Eur. J. Pharmacol. 667 (1-3), 91-99, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.064>
IF:2.737 (2010)





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

További Közlemények

4. Szikra, D., **Váradi, T.**, Nagy, I.P.: Preliminary investigations for the application of composite electrodes in organic electrosynthesis.
J. New Mat. Electr. Sys. 11 (4), 273-279, 2008.
IF:0.67

Összesített impakt faktor: 10.603

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 9.933

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.04.27

