

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A sejtmembrán organizáló szerepe az epidermális növekedési faktor és egy lipid támadáspontú gyógyszer, az elisidepsin hatásmechanizmusában

Hajdu Tímea

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

TARTALOM

Rövidítések jegyzéke (angol- magyar).....	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A sejtmembrán általános jellemzése és felépítése.....	7
2.1.1. Membrán-mikrodomének, lipidtutajok	7
2.2. Kooperativitás és linkage (kapcsoltság).....	10
2.2.1. A kooperativitás fogalma és a Hill- egyenlet	10
2.2.2. A linkage (kapcsoltság).....	13
2.3. Az EGF receptorcsalád	13
2.3.1. Az EGF receptorok általános jellemzése és osztályozása	13
2.3.2. Az EGFR szerkezeti felépítése.....	14
2.3.3. Az EGF receptorok ligandumai és szignalizációs folyamatai.....	15
2.3.4. Az EGFR homodimerizációja	18
2.3.5. Az EGFR ligandkötésének kooperativitása, Scatchard diagram.....	20
2.3.6. Az EGF receptorok és a tumorok.....	20
2.3.7. Az EGFR-hez kötődő antitestek, tirozin-kináz inhibitorok.....	21
2.4. Az elisidepsin.....	22
2.4.1. Az elisidepsin felfedezése és szerkezete	22
2.4.2. Az elisidepsin feltételezett hatásmechanizmusa.....	23
3. Célkitűzés.....	25
4. Anyagok és módszerek.....	26
4.1. Gyakran használt oldatok listája	26
4.2. Sejtvonalak és tenyésztésük	26
4.3. EGFR expresszió szint meghatározása	28
4.4. Jelölés fluoreszcens EGF-fel és intenzitásmérés áramlási citometriával	28
4.5. Áramlási citométeres fájlok kiértékelése	29
4.6. Illesztés a Hill-moddellel	30
4.7. Scatchard diagramok készítése	31
4.8. A fluoreszcens EGF hosszútávú jelenlétének vizsgálata áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával	31
4.9. Sejtek stimulálása EGF-fel.....	32
4.10. A kináz domén funkcionális gátlása kináz inhibitorokkal	32
4.10.1. Foszforilált-tirozin származékok immunfluoreszcens jelölése és vizsgálata konfokális mikroszkóppal	32
4.11. Az EGFR dimerizációjának vizsgálata homo-FRET méréssel	33
4.11.1. Kiértékelés.....	33

4.12.	Az EGF kötődés kinetikai vizsgálata áramlási citometriával.....	34
4.13.	Az F-aktin depolimerizációja latrunculin-B-vel	34
4.13.1.	F-aktin jelölése és vizsgálata konfokális mikroszkóppal	34
4.14.	Az EGFR glikozilációjának gátlása tunicamycinnel.....	35
4.14.1.	Az EGFR kimutatása western blot-tal.....	35
4.15.	Az elisidepsinre vonatkozó félhatásos gátló koncentrációk meghatározása, valamint sejtekhez kötődésének vizsgálata konfokális mikroszkópiával	35
4.16.	Az elisidepsin sejtekhez történő kötődésének vizsgálata áramlási citometriával	36
4.17.	Az elisidepsin koncentrációfüggő kötődésének és sejtmembrán-permeabilizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával	37
4.18.	Statisztikai elemzés	37
5.	Eredmények.....	38
5.1.	Az EGF sejtekhez kötődésének kinetikája és hosszútávú jelenlétének hatása a látszólagos kooperativitásra	38
5.2.	Az EGFR glikozilációjának hatása az EGF kötődés látszólagos kooperativitására	40
5.3.	A citoszkeleton polimerizációjának hatása az EGF kötődés látszólagos kooperativitására	41
5.4.	A kináz domén konformációjának és az EGFR expressziójának hatása az EGF kötődésre	44
5.5.	Az EGFR ligandkötésének új, molekuláris modellje	47
5.5.1.	A kísérleti adatok megillesztése az új modellel	50
5.5.2.	Az EGFR típusainak előfordulása a modell alapján	52
5.5.3.	A ligand hatására végbemenő klaszterizációs változások igazolása homo- FRET-tel	55
5.6.	Az elisidepsin oxigénszinttől függő kötődése a sejtekhez	58
5.7.	Az elisidepsin sejtekhez kötődésének koncentrációfüggése	61
6.	Megbeszélés.....	63
6.1.	Az epidermális növekedési faktor receptor ligandkötése.....	63
6.2.	Az elisidepsin sejtekhez kötődésének koncentrációtól és oxigénszinttől való függése ..	70
7.	Összefoglalás.....	72
8.	Summary.....	74
9.	Irodalomjegyzék.....	75
10.	Tárgyszavak.....	81
11.	Keywords	82
12.	Köszönetnyilvánítás	83
13.	Függelék.....	84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE (angol- magyar)

BSA	bovine serum albumin- borjú szérum albumin
CI	confidence interval- konfidencia intervallum
CHO	chinese hamster ovary cell line – kínai hörcsög ovárium sejtvonala
DAPI	4',6-diamidino-2'-phenylindole- 4',6-diamidino-2'-fenilindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium- Dulbecco-féle módosított Eagle médium
ECD	extracellular domain- extracelluláris domén
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid- etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermal growth factor – epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermal growth factor receptor – epidermális növekedési faktor receptor
FCS	fetal calf serum- embrionális borjú szérum
FRET	Förster resonance energy transfer- Förster típusú rezonancia energiáttranszfer
FSC	forward scatter – előre történő szóródás
GAMIG	goat anti-mouse immunoglobulin- kecskében termeltetett egér-ellenes immunoglobulin
GFP	green fluorescent protein- zöld fluoreszcens fehérje
HBSS	Hank's balanced salt solution- Hank-féle pufferelt sóoldat
KD	kinase domain- kináz domén
Lat-B	Latrunculin-B
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis- poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	phosphate-buffered saline- foszfát-pufferelt sóoldat
PVDF	polyvinylidene fluoride- polivinilidén fluorid
RTK	receptor tyrosine kinase- receptor tirozin-kináz
SDS	sodium dodecyl sulfate- szódium dodecil szulfát
SSC	side scatter – oldalra történő szóródás
TAMRA	tetramethylrhodamine- tetrametilrhodamin
TBS	tris-buffered saline- tris-pufferelt sóoldat
TMD	transmembrane domain- transzmembrán domén
TRITC	tetramethylrhodamine B isothiocyanate- tetrametilrhodamin B izotiocianát

1. BEVEZETÉS

A sejtmembrán hosszú ideje egy jelentős területe a sejtbiológiai és biofizikai kutatásoknak. Fő alkotórészei, a membránfehérjék számos hormon, gyógyszer, citosztatikum elsődleges támadáspontjai. Ezek a vegyületek különböző dinamikával, kooperativitással kapcsolódhatnak a sejtmembránhoz. Értekezésemben két eltérő szerkezetű és hatású fehérje sejtmembránhoz való kötődésének sajátosságait és kooperativitását vizsgáltam különböző modellrendszerekben.

Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptorok a sejt felszíni membrán-receptorok egy meghatározó csoportját alkotják; szerkezetük és a sejt biológiai folyamataiban betöltött szerepük jól ismert, bőséges irodalommal rendelkeznek. Az EGF receptorok a rákos folyamatok kialakulásában és a célzott molekuláris daganatterápiák kapcsán is gyakorta említésre kerülnek. Ismert, hogy egyes daganatsejtek nagyobb számban fejezik ki felszínükön a receptorcsalád egyes fehérjéit, mint fiziológias társaik. Számos kismolekula (inhibitor) került kifejlesztésre, melyek szelektíven próbálják a receptor funkcióját egy meghatározott doménjéhez kötődve szabályozni, ezek hatása a fehérje egészének működésére viszont mindmáig nem egészen ismert. Az EGF receptor ligandkötésének molekuláris részletei szintén nem teljesen tisztázottak. Mindez arra ösztönzött bennünket, hogy vizsgáljuk az EGFR extra- és intracelluláris doménjének funkcióját, azok egymásra gyakorolt hatását, továbbá kiderítsük, melyek azok a körülmények, amik befolyásolják a receptor működését. Kísérleti eredményeink egy általunk kidolgozott modellel is értelmezésre kerültek, feltárva az EGF receptor molekuláris kölcsönhatásainak dinamikáját.

A sejtmembrán támadáspontja lehet különböző daganatellenes gyógyszermolekuláknak is, melyek térhódítása szintén a célzott terápiák előtérbe kerülésének tulajdonítható. Ezek előállításának egyik módja a természetben megtalálható vegyületek karakterizálása, majd azok laboratóriumi körülmények között történő módosítása. Az elisidepsin is egy ilyen molekula, amely az eddig leírt daganatellenes szerektől eltérő hatásmechanizmussal rendelkezik, ugyanis nekrotikus sejthalált okoz. Célunk volt az elisidepsin viselkedésének minél részletesebb felderítése: egyrészt a sejtek dózis- és oxigénszinttől függő érzékenységének, másrészt a gyógyszer kötődési dinamikájának tanulmányozása.

A dolgozat alapjául szolgáló két kísérletsorozat közös nevezője a sejtmembrán. Az ismertetett eredmények összhangban állnak azon elképzelésekkel, hogy a

plazmamembrán a gyógyszer/növekedési faktor receptorhoz való kötődése által kiváltott folyamatokat jelentősen módosítja azáltal, hogy kétdimenziós felületként a diffúziót korlátozza és így az aktivált receptorok dimerjeinek vagy oligomerjeinek létrejöttét támogatja.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A sejtmembrán általános jellemzése és felépítése

A sejtmembrán az élővilág valamennyi sejtje számára nélkülözhetetlen struktúra. Elhatárolja a sejt belsejét a külvilágtól, képes egyenlőtlen ioneloszlást létrehozni a sejtek és környezetük között, ami a sejtek speciális elektromos tulajdonságait eredményezi. Biztosítja a tápanyagfelvételt és az anyagcseretermékek leadását, továbbá a membránon keresztül érzékelik a sejtek a külvilágból érkező jeleket, melyek a különböző folyamataik megváltoztatására készítetik őket. Az idegen anyagok (vírusok, baktériumok) szintén a sejtmembránon keresztül juthatnak be a sejtbe.

A biológiai membránok fő szerkezeti elemei a lipidek, fehérjék és szénhidrátok. Az emlőssejtek plazmamembránja átlagosan 40-60% lipidet, 35-50% fehérjét és 2-3% szénhidrátot tartalmaz. A kettős réteget alkotó lipidmolekulák több típusát is felfedezhetjük a sejtmembránban (foszfolipidek, szfingolipidek, ill. utóbbiak glikozilált formái és szteroidok), közös tulajdonságuk, hogy amfipatikusak, azaz erősen hidrofil és hidrofób részeket egyaránt tartalmaznak [1].

A membránfehérjék a plazmamembrán különböző specifikus funkciók ellátására szolgáló komponensei. A membránban kialakított kölcsönhatások függvényében a fehérjék két típusra oszthatók: integrális (transzmembrán) fehérjék és perifériális membránfehérjék [2]. Az integrális fehérjéknek egy vagy több, lipid kettős rétegbe ágyazott része, úgynevezett intramembrán szegmense van, melyek leggyakrabban α -hélix struktúrák [3]. Ezen kívül rendelkeznek egy extracelluláris és intracelluláris doménnel is. Ebbe a csoportba tartoznak például a peptidhormon-receptorok, köztük az EGF receptor is. Ezzel szemben a perifériális membránfehérjék a membrán külső vagy belső lipidrétegéhez vannak rögzítve különféle módokon, például hidrofób vagy elektrosztatikus kölcsönhatások révén [4]. Ide sorolhatók bizonyos enzimek (pl. protein-kináz C), vagy a sejt belső vázrendszerének egyes komponensei (pl. az aktin fehérjék).

2.1.1. *Membrán-mikrodomének, lipidtutajok*

Többkomponensű mesterséges lipidmembránokban gyakran kialakulnak stabil fázisok vagy domének. Ezeket rendezettségük és fluiditásuk alapján szokták osztályozni. A legfontosabb három ilyen doméntípus a gélfázis, a folyadékkristályos fázis („liquid disordered”) és a kettő közötti átmenetet képviselő rendezett folyadék („liquid ordered”) fázis [5]. Az élő emlős sejtekben, bár membránjuk szintén sokféle lipidből épül fel,

ezekhez hasonló stabil doméneket nem sikerült kimutatni. Kivételt képeznek az ún. ceramidban gazdag domének, melyek a szfingomielináz aktiválódása miatt keletkező jelentős mennyiségű ceramid jelenlétében kialakuló, viszonylag stabil domének [6]. Ezzel szemben különböző módszerekkel kimutatható, hogy a fent említettekkel szemben időben kevésbé stabil és sokkal kisebb méretű ún. mikrodomének léteznek az emlős plazmamembránban.

A mikrodomének a membrán olyan részterületei, melyek fizikai-kémiai tulajdonságai eltérőek a membrán többi részétől. Vizsgálatokra két alapvető megközelítés létezik. A klasszikus biokémiai definíciójuk detergens-érzéketlenségükön alapszik. Nem ionos detergensekkel történő kezelés során több sejttípus esetén megfigyelték, hogy visszamarad egy oldhatatlan frakció, amit megvizsgálva azt találták, hogy magas a gliko- és szfingolipid, illetve koleszterintartalma [7]. A másik megközelítés ezen mikrodomének mikroszkópos vizsgálata. A mikroszkópos vizsgálatok eleinte visszaigazolták a mikrodomének létezését, hiszen pl. a mikrodomének egyik komponenséhez kötődő kolera toxin B alegységével néhány száz nanométeres ilyen struktúrákat figyeltek meg [8]. Ezen megközelítés fő problémája az volt, hogy a kolera toxin B alegysége pentavalensen kötődik a mikrodomének GM1 gangliozid komponenséhez, és ezáltal keresztbe köti őket. A későbbi, FRET mikroszkópiát [9] és szuperfeloldású mikroszkópiát felhasználó vizsgálatok [10] sokkal kisebb méretű és időben sokkal kevésbé stabil struktúrákat találtak [11].

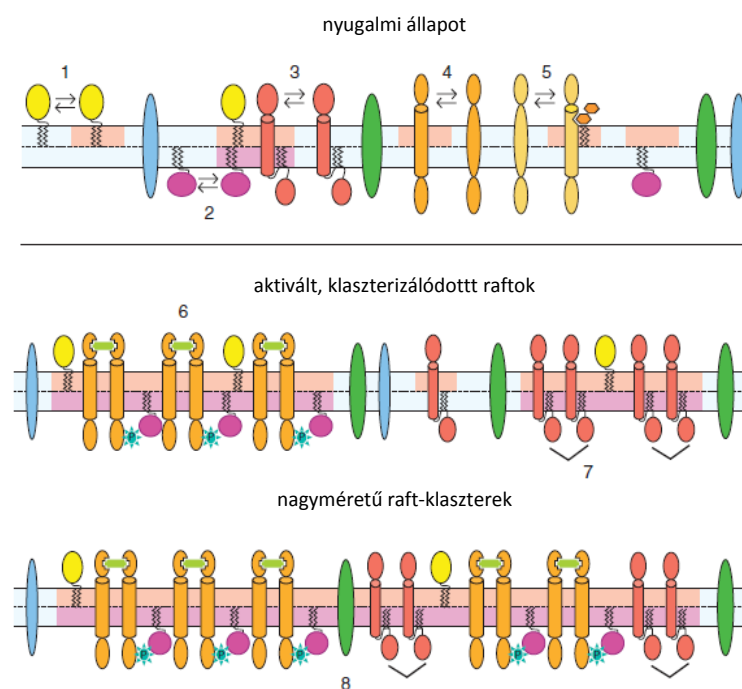
A lipidtutajok vagy más néven lipid raftok a membrán-mikrodomének egyik, talán legfontosabb alcsoportját alkotják, melyek a membrán többi részénél nagyobb mikroviszkozitással rendelkeznek. A mikrodomének stabilitásával és méretével kapcsolatban a fentebb említett aggályok alapján 2006-ban a Keystone Szimpóziumon a raftokat úgy definiálták, hogy azok „olyan kisméretű (10-200 nm), heterogén, dinamikus, szterolokban és szfingolipidekben gazdag domének, melyek kompartmentalizálják a sejtfolyamatokat. A kisebb raftok időnként stabilizálódhatnak fehérje-fehérje vagy fehérje-lipid kölcsönhatásokkal, hogy a sejtfolyamatok számára nagyobb felületet biztosíthassanak” [12].

A lipid raftok tehát koleszterinből és (gliko)-szfingolipidekből épülnek fel és képesek a membránfelszínen elhelyezkedő receptorok, valamint a citofaciális réteghez kötődő jelátvivő és átalakító fehérjék egymás közelébe hozására, toborzására; míg más fehérjéket elkülöníthetnek egymástól, azaz egyfajta jelátviteli platformot képviselnek [13].

A glikozil-foszfátidil-inozitol (GPI-) horgonyzott fehérjék jó példái a membrán külső rétegéhez kapcsolódó fehérjék toborzására, míg az Src protein tirozin-kinázok vagy a G-fehérjék telített zsírsavláncokkal kapcsolódhatnak a membrán citofaciális részéhez a lipid raftokban. A lipid raftok felépítését és klaszterizáltsági állapotát az 1. ábra szemlélteti.

Az EGFR-ről is kimutatták, hogy foszforilálódott formában a lipid raftokban lokalizálódik, valamint az EGF receptorcsalád egy másik tagja, az ErbB2 is [14].

Mivel a lipid raftok befolyásolják a sejtek proliferációját, migrációját és az apoptózist is, szerepüket a tumor terápiákkal összefüggésben is vizsgálják [15], [16].



1. ábra: A lipid raftok felépítése, klaszterizáltsági állapotai [17]

Az ábra felső részén a nyugalmi állapotú lipid raftok felépítése látható. Ezek raft lipidekből és proteinekből álló dinamikus struktúrák. A lipid kettősréteg sejt felszíni részén a szfingolipid- és koleszterintartalmú raft domének, míg a citofaciális részen a folyadék által rendezett lipid domének vannak színekkel kiemelve. A membránban kék és zöld ovális alakzatokkal a nem-raft fehérjék vannak jelölve. Egyes raft fehérjék az extracelluláris részen lipidekhez horgonyzódnak (GPI horgonyzott fehérjék, az ábrán 1-essel jelölve), míg mások a citofaciális részen dupla acilsoportokkal kapcsolódnak (2-es). Megtalálhatók a transzmembrán fehérjék is, melyek rendelkezhetnek acil-oldalláncokkal (3-as), konformációváltáson mehetnek keresztül a raftokhoz kapcsolódva (4-es) vagy glikoszfingolipidekhez kötődhetnek (5-ös).

A raft fehérjék oligomerizációja következtében - amely megtörténhet multivalens ligandum kötésével (6-os) vagy intracelluláris scaffold proteinekkal (7-es) - a kisebb lipidtutajok egyesülnek és stabilabbá válnak.

Nagyobb méretű lipid raftok többnyire akkor alakulhatnak ki, ha különböző fehérjemódosulások (pl. foszforiláció) mennek végbe, ezáltal a fehérje-fehérje

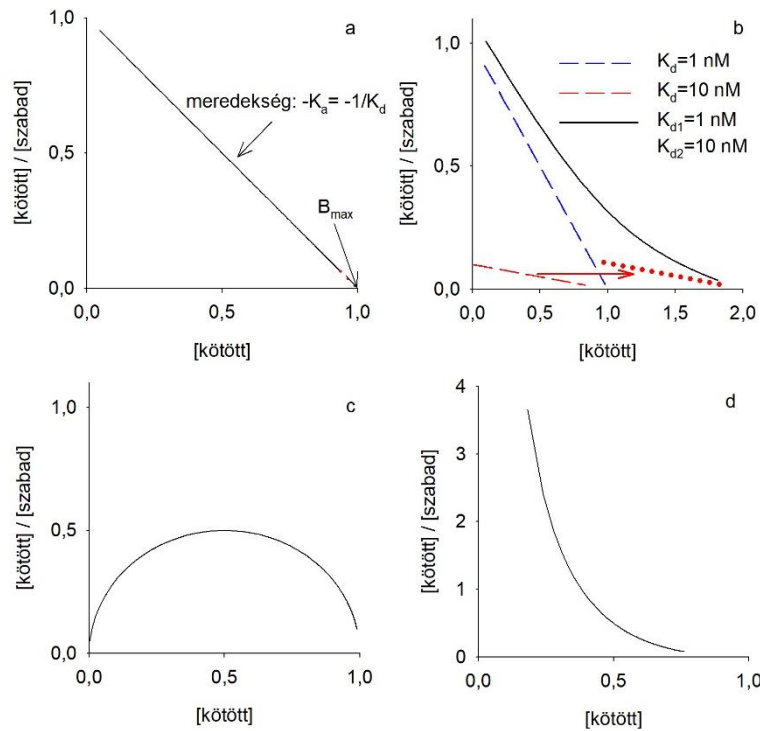
kölcsönhatások gyakorisága megnő. Az így létrejövő mikrodomének mérete a néhány száz nanométert is elérheti (8-as).

2.2. Kooperativitás és linkage (kapcsoltság)

2.2.1. *A kooperativitás fogalma és a Hill- egyenlet*

A kooperativitás a klasszikus értelmezés szerint azt jelenti, hogy egy 1-nél több kötőhellyel rendelkező fehérjénél, vagy egy monomer fehérje asszociációiban (pl. egy receptor dimerben) felléphet olyan jelenség, hogy a kötőhelyek hatást gyakorolnak egymás ligandkötésére. Ha az elsőként bekötődött ligandum elősegíti a második ligandum bekötődését, azaz annak affinitása magasabb lesz, akkor pozitív kooperativitásról beszélünk [18]. Ezzel szemben, ha az első ligandum bekötődése után a második ligandum alacsonyabb affinitással, nehezebben kötődik, akkor a kötőhelyek között negatív kooperativitás áll fenn.

A Scatchard ábrázoláskor a receptorhoz kötődött és a szabad ligandum koncentrációjának hányadosát a kötődött ligandum koncentrációjának függvényében ábrázoljuk [19]. Ahogy a 2. ábra a-panelén látható, amennyiben egy nem kooperatív kötőhely ligandkötését vizsgáljuk, a Scatchard ábrázolással egy egyenest kapunk, amely meredeksége a kötődési affinitás (K_d) reciprokának mínusz egyszerese. A legtöbb esetben azonban a Scatchard diagramok nem alkalmasak a kötődési affinitás meghatározására, amelynek több oka is lehet, pl: két darab, nem kooperatív kötőhely vizsgálata (2. ábra, b-panel) vagy pozitívan/negatívan kooperatív kötőhelyek jelenléte (2. ábra c és d-panel). Amennyiben a ligandkötő helyek között valamilyen kooperativitás áll fenn, a Scatchard görbe alakja jellemzi a kooperativitás jellegét, ugyanis felülről konkáv görbe esetén (2. ábra d-panel) negatív, míg alulról konkáv görbe esetén (2. ábra c-panel) pozitív kooperativitás tételezhető fel [20], [21].



2. ábra: A Scatchard ábrázolás

A görbék a kötött és szabad ligandum koncentrációjának hányadosát ábrázolják a kötött ligandum koncentrációjának függvényében. **a:** Egy nem kooperatív kötőhely, mely 1 nM-os K_d -vel rendelkezik. **b:** Két nem kooperatív kötőhely, melyek 1 nM-os és 10 nM-os K_d -vel rendelkeznek (fekete folytonos vonallal jelölve). Kék és piros szaggatott vonallal külön-külön ábrázoltam az 1 nM-os és a 10 nM-os K_d -ű kötőhelyeket, a piros pontozott vonal pedig az utóbbi eltolása úgy, hogy illeszkedjen a fekete görbére. Látható viszont, hogy a két egyedi kötőhely K_d értékét nem lehet ilyen módon pontosan meghatározni, mert a színes egyenesek meredeksége nem jósolható meg a fekete görbéből. **c:** $n=2$ -es Hill-koefficienssel rendelkező, pozitívan kooperatív kötőhely ($K_d=1 \text{ nM}$); **d:** $n=0,5$ -ös Hill-koefficienssel rendelkező, negatívan kooperatív kötőhely ($K_d=1 \text{ nM}$). A Hill-koefficiens értelmezéséről az alfejezet későbbi részében lesz szó.

A 2. ábrán szereplő görbék csak illusztrációként szolgálnak annak tisztázására, hogy a Scatchard görbe alakja miként alakul, ha pozitívan vagy negatívan kooperatív kötőhelyeket tételezünk fel a Hill-egyenlettel történő illesztésből következőleg, illetve abban az esetben, ha nem mutatható ki kooperativitás. Azonban mint említettük, a Scatchard görbéről nem lehet a Hill-együtthatót, és a legtöbb esetben a K_d -t sem közvetlenül meghatározni, ahhoz a modellel történő illesztésre van szükség. A Scatchard ábrázolás csak a kooperativitás kvalitatív jellemzésére alkalmas, ahogy azt az EGF receptorral kapcsolatban is a leggyakrabban alkalmazzák [22], [23], ezért választottuk mi is ezt az ábrázolási módot vizsgálataink során.

A Hill-modell

A Hill-modellt gyakran alkalmazzák az élő sejtekben lejátszódó biokémiai folyamatok leírására, dózis-hatás görbék készítésére. Ha ligandkoncentrációtól függő kötődési reakciókat vizsgálunk a modell használatával, akkor a kísérletesen meghatározott paraméter (fluoreszcenciaintenzitás, élő sejtek aránya, stb) kerül illesztésre a rendszerhez adott ligandkoncentráció függvényében.

Tételezzünk fel egy „n” db kötőhellyel rendelkező fehérjét. A tökéletesen pozitív kooperativitás arra utalna, hogy az „n” db kötőhely mindegyike csak akkor tud ligandumot kötni, ha a többi is éppen ligandumot köt, azaz vagy egyidejűleg kötnek, vagy sehogy. Mindössze ez a két fehérjeállapot figyelhető meg, amelyek között termodinamikai egyensúly van. Ez a Hill-modell. Ennek egyszerű sémáját az alábbi egyenlet mutatja:



ahol P a ligandumot nem kötött receptor, L a ligandum, PL_n pedig az n darab ligandumot kötött receptor.

Az erre az esetre vonatkozó asszociációs állandó:

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n}, \quad (2)$$

ahol K_a az asszociációs állandó, a szögletes zárójelek pedig a moláris koncentrációkat jelölik.

A fenti egyenlet átrendezésével az alábbi összefüggést kapjuk:

$$K_a [L]^n [P] = [PL_n] \quad (3)$$

A telítési egyenletet erre az esetre az alábbiak szerint írhatjuk fel:

$$\theta = \frac{[PL_n]}{[PL_n] + [P]} = \frac{K_a [L]^n [P]}{K_a [L]^n [P] + [P]} = \frac{K_a [L]^n}{K_a [L]^n + 1} = \frac{[L]^n}{[L]^n + \frac{1}{K_a}} = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d}, \quad (4)$$

ahol θ a ligand által kötött receptorfehérje koncentrációját jelöli.

A fenti egyenletet Hill-egyenletnek nevezzük, amely figyelembe veszi azt, hogy „n” db kötőhely van, amelyek egymással kooperálnak. „n” jelöli a Hill-együtthatót, amely tökéletesen kooperatív rendszereknél megegyezik a fehérje kötőhelyeinek számával. K_d

a disszociációs konstans, az asszociációs konstans reciproka, ami a ligandkötődés affinitását, erősségét jellemzi [24].

A Hill-együttható értékét kísérletesen meghatározva, pozitív kooperativitás esetén rendszerint 1 és a kötőhelyek számának számértéke közötti értéket kapunk. Azonban ezt az értéket a klasszikus értelemben vett molekuláris kooperativitás, ahol a két ligandum bekötődését külön-külön K_d -ekkel írjuk le, illetve a linkage (kapcsoltság, lsd. 2.2.2. fejezet) egyaránt befolyásolja. Emiatt a Hill-egyenlettel kapott koefficiensekre a továbbiakban látszólagos kooperativitásként fogok utalni.

2.2.2. A linkage (kapcsoltság)

A kooperativitás tehát azt mutatja meg, hogy a két vagy több kötőhelyes makromolekulák (vagy fehérje dimerek/oligomerek) egyik alegységének ligandkötése hogyan befolyásolja a többi alegység ligandkötését.

Ezzel szemben az oligomerizációs linkage azt jelenti, hogy a receptor ligandumot kötött és nem kötött változatai különbözőképpen dimerizálódnak [25]. Ez a jelenség a ligandum hatására végbemenő konformációváltozásokra utal, melyet az EGFR esetén régóta leírtak az irodalomban [26]. Célszerű azonban elkülöníteni ezt a fogalmat a kooperativitástól, mivel pozitív linkage esetén is fennállhat negatív kooperativitás, amennyiben a receptor-dimerhez az első ligandum magasabb affinitással kötődik, mint a második.

2.3. Az EGF receptorcsalád

2.3.1. Az EGF receptorok általános jellemzése és osztályozása

Az EGF/ErbB receptorcsalád a receptor tirozin-kinázok (RTK) prototípusának tekinthető. Fontos szerepet játszanak az intracelluláris jelátviteli folyamatokban, a sejtdifferenciációban, az apoptózisban, valamint a fiziológias és patológias sejtosztódásban.

A receptorcsalád négy tagja az EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 és ErbB4/HER4 [27]. Legszélesebb körben az EGFR-t vizsgálták eddig és jelen disszertációban is erről lesz részletesen szó.

Az EGF receptorok ligandumai különböző peptid növekedési faktorok (EGF, betacellulin, stb), melyek membránhoz kötött prekursor fehérjékként szintetizálódnak [28]. A sejtfelszíni proteázok általi hasításukat követően kötődnek az EGFR extracelluláris doménjéhez, előidézve annak aktivációját. Az EGFR leggyakrabban

tanulmányozott liganduma az 53 aminosavból álló EGF. Az EGF receptorok ligandumainak részletes bemutatásával a 2.3.3. fejezet foglalkozik.

Funkcionálisan az ErbB2, valamint az ErbB3 receptor különbözik a család többi tagjától. Az előbbi nem képes ligandkötésre, mivel szubsztrátkötő zsebe túl kicsi. Aktivációja éppen ezért csak más ErbB fehérjékkel létrehozott heteroasszociátumok vagy jelentős overexpresszió révén valósulhat meg. Utóbbi esetben ErbB2 homodimerek is kialakulhatnak, melyek képzése az elektrosztatikus taszítás miatt egyébként nem jellemző [29]. Ezzel szemben az ErbB3 nem rendelkezik tirozin-kináz aktivitással egy, a kináz doménben található aminosav-szubsztitúció miatt, ám gyakran képez heterodimereket a többi ErbB fehérjével [30].

2.3.2. Az EGFR szerkezeti felépítése

Az EGF receptorok mindegyike rendelkezik egy extracelluláris doménnel, ezt követi az α -helikális szerkezetű transzmembrán régió, amelyhez kötődik a juxtamembrán domén. Intracellulárisan helyezkedik el a tirozin-kináz domén és a C-terminálison a foszfo-tirozint kötő effektor molekulák kötőhelyei. Az EGFR szerkezeti felépítése a 3. ábra A-panelén kerül bemutatásra.

Az EGFR extracelluláris doménje 622 aminosavból áll, amely 4 szubdoménre osztható. Az EGF megkötésében az I-es és III-as szubdomén vesz részt, melyek az extracelluláris domén inaktív, ún. zárt konformációjában egymástól távol helyezkednek el [31]. A ligandum kötődését kísérő konformációváltozás során az I-es és III-as szubdomének C-alakzatba rendeződnek, hogy a ligandum beékelődjön közéjük. A ligandkötődést kísérő konformációváltozás egy másik megnyilvánulása az, hogy a II-es szubdoménből kiválik egy 20 aminosavszármazékból álló hurok. Ezt a struktúrát dimerizációs karnak nevezzük, mivel képes kapcsolódni egy szomszédos receptorban szintén megtalálható hurokhoz, hidrofób kölcsönhatások révén [32], [33]. Zárt konformáció esetén azonban ez a hurok a IV-es alegységgel alakít ki intramolekuláris kölcsönhatást, így rejtve marad. Az extracelluláris domén ligandkötött konformációját a II-IV domének közötti kapcsolat hiánya miatt nyitottnak nevezzük [34].

Az EGFR transzmembrán doménje (TM) kb. 23 aminosav hosszúságú α -hélix. Egyes kutatások szerint két TM is képes egymáshoz kapcsolódni egy EGF stimulált EGFR dimerben, az N-terminális GxxxG motívumot tartalmazó régióikon keresztül [35], [36].

Az extracelluláris juxtamembrán régió (eJM) egy mindössze hét aminosavból álló polipeptid nyúlvány, mely az extracelluláris domén C-terminálisát választja el a TM hidrofób régiójától. E két domén térbeli kapcsolata bizonyítottan jelentős, mivel kísérletesen kimutatták, hogy ha az eJM doménhez egy flexibilis linker régiót szintetizálnak, az a receptor ligandumtól független aktiválódásához vezet [36], [37].

Az intracelluláris juxtamembrán régióról (iJM) kimutatták, hogy fontos szerepet tölt be az EGF-indukálta autofoszforylációban [38]. Felfedezték egy aktivációs domén jelenlétét az iJM régió belül, amely a kináz domének ún. aszimmetrikus dimerjeiben összeköti az aktivátor tirozin-kináz domén C (karboxi)-lebenyét és a fogadó kináz N-terminálisát [39]. Feltehetően azonban az iJM régió egyéb részei is fontos szerepet töltenek be az EGFR megfelelő működésében [38].

Az EGFR intracelluláris doménje ~540 aminosavból áll, amely tartalmazza a tirozin-kináz domént (TKD), mely két részre osztható: az N (amino)- és C (karboxi)-lebenyre. Ehhez kapcsolatosan megtalálható a ~230 aminosavból álló C-terminális farki rész. A kináz domén aktív és inaktív konformáció felvételére képes, ennek szabályzásában fontos szerepe van a két lebeny között elhelyezkedő aktivációs huroknak, mely tartalmaz egy konzervált Asp-Phe-Gly (DFG) motívumot. Inaktív konformáció esetén az aszpartát oldallánc kifordul a katalitikus centrumból és egy rövid hélixet alkot, így nem tud ATP bekötődni. Ezen kívül az inaktív kinázban az N-lebenyen található α C-hélix a katalitikus centrumhoz képest kifelé orientálódik.

Ha a kináz domén aktív konformációba kerül, az aktivációs hurok és az α C hélix is a katalitikus centrum irányába fordul, elősegítve a szubsztrát bekötődését [40].

2.3.3. *Az EGF receptorok ligandumai és szignalizációs folyamatai*

Az EGF receptorok homo- illetve heteroasszociációs hálózatai a jelátvitel változatosságát eredményezik. Emberben eddig több mint 30 fehérjét azonosítottak az EGF receptorok ligandumaiként, amelyek transzmembrán prekursorokként szintetizálódnak, majd extracelluláris doménjük lehasítódik, így válnak szolubilis molekulákká [28]. A 4. ábra szemlélteti a fontosabb ligandumokat, melyeket targetjeik szerint az alábbi csoportokra oszthatunk:

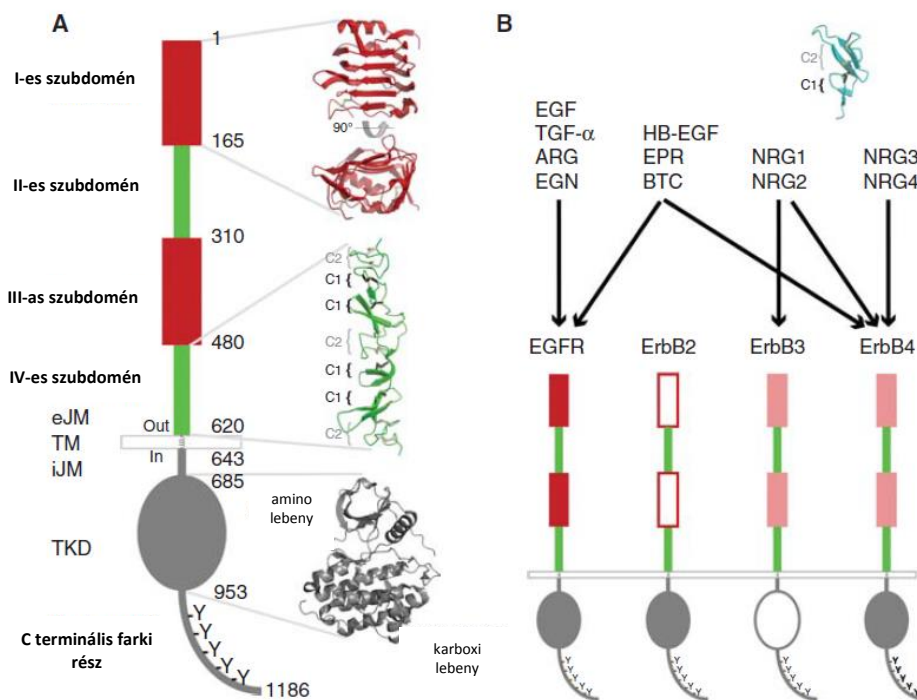
- Kizárólag az EGFR-hez kötődő ligandumok:
EGF; transforming growth factor- α (TGF- α); amphiregulin (ARG/AREG)
- Az EGFR-hez és ErbB4-hez egyaránt kötődő ligandumok:

epiregulin (EREG); epigen (EPG); betacellulin (bCEL); heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF)

- ErbB3-hoz és ErbB4-hez kötődni képes ligandumok: neuregulinok
NRG1/Neu/hereregulin; NRG2; NRG3; NRG4

A kereszt-foszforilálódott tirozin oldalláncok a receptor dimerben a citoplazmatikus enzimek és adapter fehérjék kötőhelyeül szolgálnak. Amint az ily módon aktiválódott effektor és adapter fehérjék leválnak, a citoplazmában számos jelátviteli kaszkádot képesek stimulálni. Végül a szignál általában a receptor-ligandum komplex endocitózisával végződik.

Az EGFR közvetítésével végbemenő fontosabb jelátviteli útvonalak között említhető a MAPK (mitogen-activated protein kinase), a PI3K (phosphoinositol-3-kinase) és az Akt (anti-apoptotic kinase) útvonal. Ezek olyan fiziológiás válaszokat váltanak ki a sejtől, mint a proliferáció, sejtnövekedés, differenciáció, migráció, gyulladásra adott válaszreakció vagy az apoptózis [41], [42]. Az ErbB fehérjékhez kötődő ligandumokat, a fontosabb jelátviteli lépéseket és a sejtszintű válaszreakciókat a 4. ábra szemlélteti.

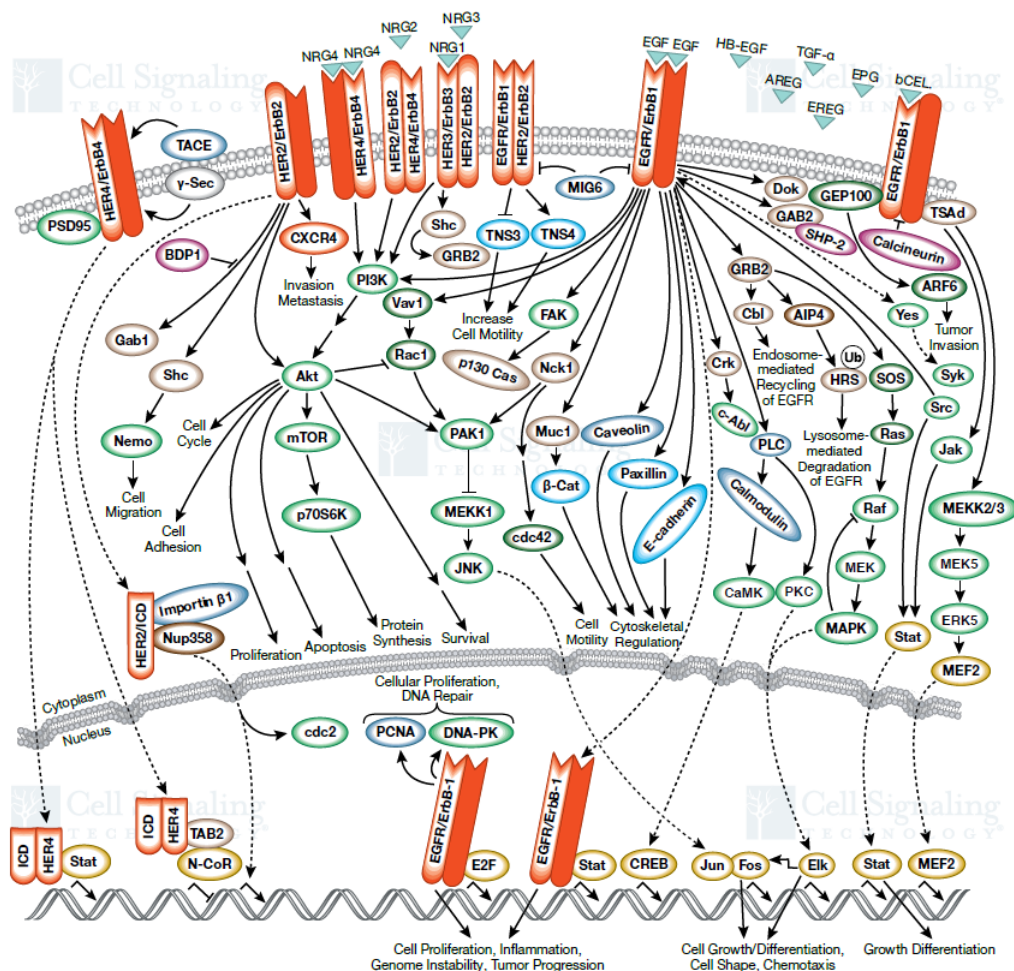


3. ábra: Az EGF receptorok szerkezeti felépítése és ligandumai [34]

A: Az EGFR extracelluláris, transzmembrán és tirozin-kináz doménjének felosztása szubdoménekre. Fentről lefelé haladva az extracelluláris régió 4 szubdoménje látható (a ligandum megkötésében résztvevő I-es és III-as szubdomén pirossal van jelölve, a dimerizációban szerepet játszó II-es és IV-es szubdomének

zölddel). Ezt követi a transzmembrán hélix az extra-, valamint intracelluláris juxtamembrán régióval (eJM, iJM), majd a szürkével jelölt tirozin-kináz domén (TKD). Utóbbi konformációváltozásait az amino- és karboxi leány között végbemenő kölcsönhatások befolyásolják. A C-terminális farki rész tartalmazza a tirozin autofoszforylációs oldalláncokat.

B: Az EGF receptorcsalád többi tagjának és azok leggyakoribb ligandumainak ábrázolása: a ligandumot kötni nem képes ErbB2, a kináz aktivitással nem rendelkező ErbB3, valamint az ErbB4. Az EGFR az ún. EGF-szerű fehérjékkel, valamint a bispecifikus, ErbB4-hez is kötődni képes ligandumokkal aktiválódik (EGF, TGF- α , amphiregulin [ARG], epigen [EGN], epiregulin [EPR], betacellulin [BTC], heparint kötő EGF-szerű növekedési faktor [HB-EGF]). A neuregulin 1 és 2 (NRG1, NRG2) az ErbB3 és ErbB4-hez egyaránt kapcsolódik, míg a neuregulin 3 és 4 (NRG3, NRG4) csak az ErbB4-hez.



4. ábra: Az EGF receptorcsalád jelátviteli hálózata (Cell Signaling Technology, ErbB/HER signaling; www.cellsignal.com)

Az EGF receptorok homo- és heteroasszociátumai, illetve az azok által kötött növekedési faktorok láthatóak az ábra felső részén. Közvetítésükkel jelátviteli folyamatok egy egész sora játszódik le a citoplazmában, köztük a már említett PI3K-Akt útvonal is (ábra középső része). Egy másik kiemelt útvonal során a MAPK aktiválódik, ami a sejtmagba kerülve (ábra alsó része) egyes transzkripciós faktorokat aktivál (Elk, Fos).

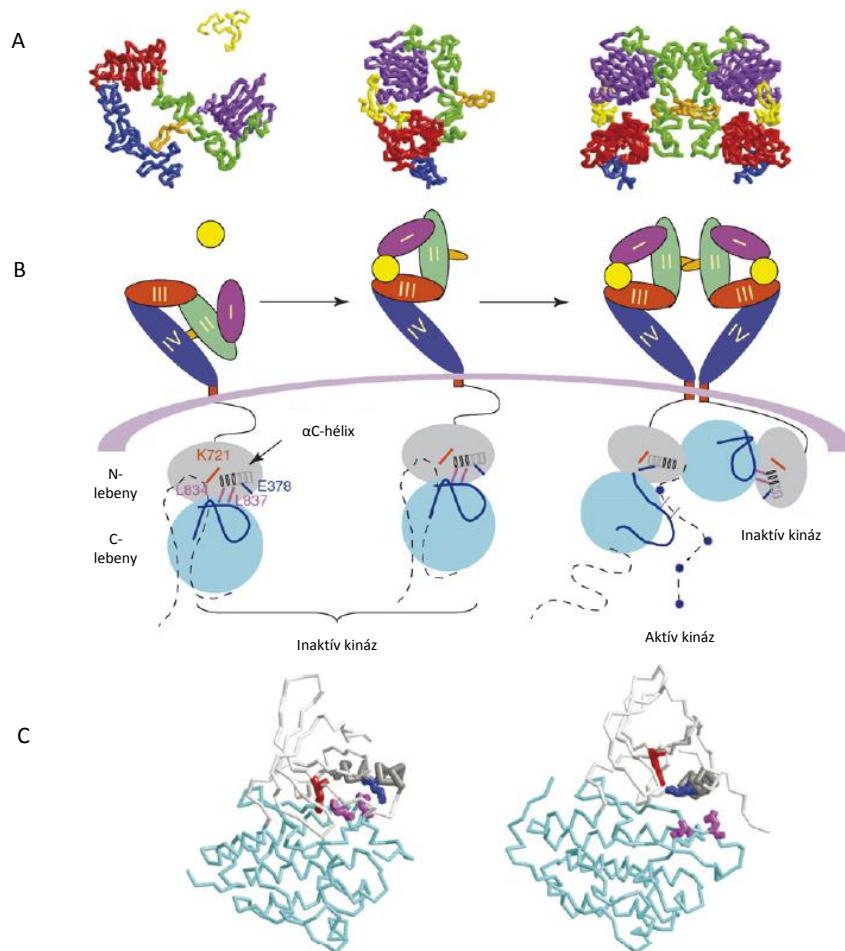
2.3.4. Az EGFR homodimerizációja

A klasszikus elmélet szerint az EGFR-re a ligandum általi dimerizációs és aktivációs mechanizmus a jellemző. Ennek értelmében az EGF a receptor extracelluláris doménjének I-es és III-as alegységéhez kötődik egyszerre, majd a végbemenő konformációváltozások eredményeként szabaddá válik az a dimerizációs kar, amely kapcsolódni képes egy szomszédos, szintén aktiválódott EGFR-hez, ahogy azt az 5. ábra B- panelén szemléltettük. [26].

Az újabb eredmények, köztük munkacsoportunk vizsgálatai is arra világítottak rá, hogy ligandum híján nem csak monomer konformációban van jelen az EGFR, hanem vannak a membránban előre összeszerelődött, ligandumtól független dimerek is [43] [44]. Ezen kisméretű homoklaszterek mérete ligandummal történő stimuláció esetén nő [45].

Bár az EGFR aktivációjával összefüggő dimerizációjában elsősorban az extracelluláris domén fentebb leírt konformációváltozása vesz részt, a transzmembrán domén és a kináz domén is hozzájárul a folyamathoz. Az 5. ábra B-panele szemlélteti a kináz domén szerkezeti felépítését és a létrejövő kináz dimer típusokat. Az aszimmetrikus kináz domén dimerben van egy fogadó kináz, amely inaktív állapotban van, ehhez kapcsolódik az aktív konformációban lévő kináz, mely aktiválja a másik alegységet. Ehhez a mechanizmushoz nagyban hasonlít a ciklin dependens kinázok (cdk) aktiválódása a -sejtciklus során változó minőségben és mennyiségben termelődő- ciklinek által.

Szimmetrikus kináz domén dimerek szintén kialakulhatnak, ebben az esetben mindkét kapcsolódó kináz inaktív konformációban van. Irodalmi adatok alapján azonban ez a típus kevésbé vesz részt a jelátviteli folyamatokban [40], [46].



5. ábra: Az EGFR dimerizációjának háttérében álló konformációváltozások [47]

Az ábra A- panelén az EGFR extracelluláris doménjének (ECD) sematikus, illetve 3D szerkezeti ábrázolása látható, míg ugyanez a kétféle ábrázolás mutatja be a tirozin-kináz domént a B és C-paneleken. A lila félkör a sejtmembránt jelöli. Az extracelluláris domén I-es és III-as alegységéhez egyidejűleg kötődő ligandum (a sematikus ábrán lila, piros és sárga színnel jelölve a két alegység és a ligandum) hatására szabadabbá válik a II-es alegységen található dimerizációs kar (az ábra B-panelén narancssárgával jelölve). A dimerizációs kar kapcsolódik a szomszédos ECD-ben szintén megtalálható dimerizációs karhoz és létrejön a receptor dimer.

A tirozin-kináz domén sematikus ábráján az N-lebény szürkével, a C-lebény kékkel van jelölve. A két lebény között elhelyezkedő aktivációs hurkot sötétkék vonal, míg a C-terminális farki részt szaggatott vonal jelzi. Néhány, az intramolekuláris kölcsönhatások során kitüntetett szerepet játszó aminosav, valamint az α C- hélix szintén fel van tüntetve. Az L834-es és L837-es aminosavak inaktív konformáció esetén rejtve maradnak és az α C- hélix irányába orientálódnak. Az ECD-k dimerizációja a tirozin-kináz doméneket is egymás mellé hozza és az egyik domén C-lebénye a másik N-lebényéhez kapcsolódik (jobb szélső ábrarész) és egy aszimmetrikus dimert kapunk, ahol az egyik kináz aktív, a másik inaktív állapotban van. Az aktiválódott kinázban megváltozik az α C- hélix orientációja, a felszínre kerül az L834-es és L837-es aminosav, valamint az E378-as és a K721-es aminosavak sőhidat képeznek. Az aktív kináz transz-foszforilálja a dimerizációs partner C-terminálisának tirozin származékait.

2.3.5. Az EGFR ligandkötésének kooperativitása, Scatchard diagram

Az EGFR vonatkozásában a kvantitatív kötődéses vizsgálatok során gyakran felülről konkáv Scatchard görbék születtek, melyet alacsony és magas affinitású kötőhelyek létezésével magyaráztak évtizedekig [48], [49], [50]. Ezt követően a negatív kooperativitás vált a legszélesebb körben elfogadott elképzeléssé, magyarázatot adva az EGF kötődésnél megjelenő heterogenitásra [51].

A negatív kooperativitásra néhány, az extracelluláris domént érintő szerkezetvizsgálati tanulmány is bizonyítékot szolgáltat. Egy munkacsoport a *Drosophila* EGFR extracelluláris doménjének kristályosítása során megállapította, hogy a szolubilizált receptor negatív kooperativitással képes ligandumkötésre. A jelenség magyarázata a *Drosophila* EGFR extracelluláris doménjére jellemző aszimmetrikus dimerek jelenléte, amelyekben az egyik ligandkötő domén -konformációjából adódóan-korlátozottan férhető hozzá a ligandum számára [52].

Az emberi EGFR-t vizsgálva negatív kooperativitást csak abban az esetben tudtak detektálni, ha a ligandum nemcsak az extracelluláris doménhez, hanem a teljes, intakt receptorhoz kötődött. A *Drosophila* EGFR esetében leírt aszimmetrikus dimereket pedig csak alacsonyabb affinitással kötődő ligandumok alkalmazása mellett lehetett kimutatni a humán receptor esetében [53].

Az irodalomban azonban számos, a pozitív EGF kötődési kooperativitást valószínűsítő tanulmányt is találhatunk [54], [55], [56], [57].

Az élő sejtek EGF kötését feltehetően számos tényező befolyásolhatja, úgymint a ligandkötésben közvetlenül nem résztvevő alegységek konformációi, esetleg más struktúrák (pl. citoszkeleton) jelenléte és kölcsönhatásai az EGF receptorral. A kináz domén aktív vagy inaktív konformációjának a kooperativitásban betöltött szerepét néhány, nemrégiben megjelent tanulmány is vizsgálja [58], [59], ahogy a jelen disszertáció is.

2.3.6. Az EGF receptorok és a tumorok

Az EGF receptorok közül az EGFR és az ErbB2 az, amelyeket a leggyakrabban összefüggésbe hoznak a rákos folyamatokkal. Az eddig feltárt genetikai változások között említendő a génamplifikáció, mely a fehérje fokozott kifejeződéséhez vezet, a kináz domén aktivációját érintő mutációk, deléción az EGFR extracelluláris doménjében, továbbá az EGFR és ligandumának együtt történő expressziója. A mutációk hatására a

szerkezetben végbemenő változások a receptor fokozott aktiválódásához, ezáltal a jelátviteli útvonalak rendellenes lefolyásához vezetnek [60].

Az EGFR számos tüdőrák típusban fontos szerepet játszik. A kináz doménben történt mutációk a tüdőrákos esetek 10-40%-ánál fordulnak elő [61], [62].

Az EGFR génamplifikációja az adenokarcinómák 15%-ban és a laphámsejtes karcinómák 30%-ban fordul elő. A nem kissejtes tüdőrákok (NSCLC) 60%-ánál, az emlődaganatok 15-30%-ánál mutatható ki az EGFR overexpressziója [61], [63].

Az ErbB2 overexpressziója vagy gén-felsokszorozódása az emlődaganatok 20-30%-ánál fordul elő, de gyakoriak a pontmutációk is, elsősorban a tirozin-kináz doménben [64].

Az EGF receptorcsaládot, és annak jelátviteli folyamatait több évtizede intenzíven vizsgálják, ami lehetővé tette számos célzott-terápiás módszer kidolgozását, úgymint EGFR ellenes monoklonális antitestek, tirozin-kináz inhibitorok és olyan molekulák, melyek az EGFR chaperonokhoz kötődnek, majd a receptor lebontását segítik elő. Ezekről részletesebben a 2.3.7. fejezetben lesz szó.

2.3.7. Az EGFR-hez kötődő antitestek, tirozin-kináz inhibitorok

- EGFR ellenes monoklonális antitestek

Az EGFR ellenes monoklonális antitestek az extracelluláris domén egy meghatározott régiójához kapcsolódnak nagy affinitással. Bekötődés után egyrészt gátolják a receptor ligandkötését, másrészt a receptor internalizációját, downregulációját és tumor-ellenes citotoxicitási immunválaszt idéznek elő.

A legsikeresebben alkalmazott EGFR ellenes antitest a cetuximab (Erbix®), amely egy kiméra egér/humán immunglobulin-G. Az ECD III. szubdoménjéhez kötődik, majdnem a teljes ligandkötő felületet elfoglalva. A klinikumban elsősorban a vastagbélrákos és fejnagyaki daganatos esetek kezelésére használják [65].

- Tirozin-kináz inhibitorok

Az EGFR-ellenes terápiás szerek másik csoportjába a tirozin-kináz inhibitorok tartoznak. Ezek olyan kisméretű, sejtmembrán-permeábilis molekulák, amelyek az EGFR kináz régiójával lépnek kölcsönhatásba, semlegesítve enzimátikus aktivitását. A legtöbb inhibitor a kináz domén adenosin-trifoszfát (ATP) kötőhelyével alakít ki kovalens vagy egyéb kölcsönhatást, ennek függvényében beszélhetünk irreverzibilis vagy reverzibilis inhibitorokról [66]. Az előbbire példa a canertinib, a pelitinib és a neratinib, míg reverzibilis inhibitorokként tartják számon a gefitinibet, az erlotinibet és a lapatinibet.

Ezenkívül az inhibitorokat csoportosíthatjuk aszerint is, hogy a kináz mely konformációját stabilizálják.

I-es típusú inhibitorok

Ebbe a csoportba tartozik a legtöbb ATP analóg inhibitor, melyek a kináz aktív konformációját ismerik fel [67]. Heterociklikus gyűrűs szerkezettel rendelkeznek, képesek elfoglalni a purin bázis kötőhelyét. I-es típusú inhibitorra példa a gefitinib (Iressa®) vagy az erlotinib (Tarceva®), amelyeket már több éve alkalmaznak a klinikumban [68].

II-es típusú inhibitorok

A II-es típusú inhibitorok a kináz domén inaktív konformációját ismerik fel. Ebben az esetben a DFG motívum kifelé áll, így egy további hidrofób kötőhely válik szabaddá, közvetlenül az ATP kötőhely mellett [67]. Ebbe a csoportba sorolható a lapatinib (Tykerb®) vagy a neratinib (PB272) [68], [69], [70].

Mivel a klinikai kezelések során gyakran alakul ki rezisztencia az alkalmazott inhibitorral szemben, továbbá az EGFR-nak is számos mutációja fordul elő a tumorokban, a harmadik generációs inhibitorokat kifejezetten úgy tervezik, hogy a mutálódott receptorhoz legyenek képesek kapcsolódni kovalens kötéssel [66]. Itt említhető például az osimertinib (AZD9291), melynek célpontja a receptor T790M mutáns változata, amely az inhibitorokkal szembeni rezisztencia gyakori oka. Ezt az inhibitorot az FDA 2015-ben hagyta jóvá [66].

2.4. Az elisidepsin

2.4.1. *Az elisidepsin felfedezése és szerkezete*

A Kahalalide-F egy tengeri eredetű, tumorellenes hatásokkal rendelkező molekula, melyet egy puhatestűből (*Elysia rufescens*) izoláltak, majd egy közeli analógját szintetikusán kezdték gyártani, amely az elisidepsin (Irvalec®, PM02734) nevet kapta. Az elisidepsin egy gyűrűs depszipeptid, mely *in vitro* körülmények között számos daganat kezelésében bizonyult hatásosnak. A National Cancer Institute (NCI) „Compare” analízise alapján tumoros sejtvonalakon kifejtett hatásspektruma különbözik minden egyéb, eddig karakterizált vegyületétől, ezért a várakozások szerint az elisidepsin, az addig sok kemoterapikummal szemben rezisztens tumorok kezelésére is megoldást jelenthet. Fázis II klinikai vizsgálatát már azelőtt megkezdték, hogy

Olyan feltételezések is születtek, melyek szerint az ErbB fehérjék expressziója és az elisidepsin-érzékenység között korreláció figyelhető meg, azonban munkacsoportunk korábbi kísérletei ezt meggyőzően cáfolták. Kimutatták, hogy az ErbB1, ErbB2 és ErbB3 fehérjéket jelentősen különböző mértékben kifejező sejtek is hasonló érzékenységet mutatnak az elisidepsin iránt [77].

Összességében tehát az elisidepsin egy biztatónak tűnő gyógyszermolekula jelölt, optimizmusra okot adó antitumor hatásának és terápiás indexének köszönhetően fázis II vizsgálatoknak is alávetették [78].

3. CÉLKITŰZÉS

Az Irodalmi áttekintés fejezet alapján azt feltételezzük, hogy a sejtmembrán, mint egy kétdimenziós hordozófelület, a benne található, gyógyszerek és növekedési faktorok támadáspontjául szolgáló fehérjék és lipidek magasabb rendű szerveződési formáit (klasztereit) hozza létre. Minden molekula hatását, amennyiben az specifikus receptorhoz kötődik, alapvetően a receptorhoz való kötődése határozza meg. A sejtmembrán azonban ezen receptorok oligomerizációján keresztül az aktivált receptor által kiváltott hatásokat jelentősen módosítja, finomhangolja.

Dolgozatomban két különböző molekulával (egy növekedési faktor és egy gyógyszerjelölt) kapcsolatban vizsgáltam, hogy hatásukat hogyan befolyásolja a sejtmembrán fent említett szervezőképessége.

- Vizsgálni kívántuk az EGFR ligandkötésének jellemzőit: kinetikáját, affinitását, kooperativitását és koncentrációfüggését
- Arra is kerestük a választ, hogy az EGF kötődés kooperativitását és affinitását milyen körülmények befolyásolják (az EGF hosszútávú jelenléte a rendszerben, a citoszkeleton polimerizáltsági állapotai, a receptor glikozilációja)
- Azt is tanulmányoztuk, hogy a kináz domén bizonyos konformációi hogyan befolyásolják a ligandkötés kooperativitását és affinitását
- Az előző pontban kapott eredmények molekuláris szintű értelmezéséhez egy olyan modellt kívántunk létrehozni, amely nemcsak feltárja az EGF kötődés hátterében álló kölcsönhatások részleteit, hanem képes megjósolni az egyes receptor típusok előfordulási valószínűségét a ligandummal történő stimuláció függvényében
- Az elisidepsinnel kapcsolatban célunk a gyógyszer hatásmechanizmusának részletes felderítése, a daganatokban gyakran előforduló oxigénhiányos állapot szerepének vizsgálata
- Vizsgálni kívántuk a gyógyszer sejtmembránhoz való kötődésének jellemzőit: kooperativitását és klaszterizációját.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Gyakran használt oldatok listája

HBSS

- 137 mM NaCl
- 5,4 mM KCl
- 4,2 mM NaHCO₃
- 1,3 mM CaCl₂
- 1 mM MgSO₄
- 0,5 mM glükóz
- 0,44 mM KH₂PO₄
- 0,25 mM Na₂HPO₄

Desztillált vízben oldva, a pH-t szükség esetén 7,4-re kell állítani

PBS

- 150 mM NaCl
- 8,6 mM Na₂HPO₄
- 3,22 mM KCl
- 1,69 mM KH₂PO₄

Desztillált vízben oldva, a pH-t szükség esetén 7,4-re kell állítani

TBS

- 150 mM NaCl
- 20 mM Tris

Desztillált vízben oldva, a pH-t szükség esetén 7,4-re kell állítani

Tripszin-EDTA

- 0,5 g tripszin
- 0,2 g EDTA

1000 mL PBS-ben oldva és sterilre szűrve

4.2. Sejtvonalak és tenyésztésük

Az EGF kötődésének vizsgálata során két sejtvonalat használtunk: A431, mely egy humán epidermoid karcinóma sejtvonal, valamint F1-4, ami CHO (kínai hörcsög ovárium) sejtek GFP-vel konjugált EGFR-t stabilan kifejező változata. Az utóbbit göttingeni kollaborációs partnereink állították elő [79]. A sejtvonalak EGFR expresszió szintjének meghatározása DAKO Qifikit kalibrációs gyöngyök segítségével történt, ennek eredményét és módszertanát az 1. táblázat és a 4.3. fejezet tartalmazza.

Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata során az alábbi sejtvonalakat használtuk: A431, CHO, HaCaT (humán keratinocita), HeLa (humán méhnyak

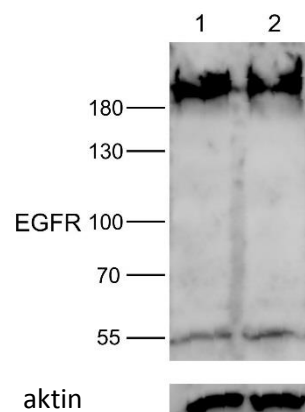
karcinóma), MCF7 (humán emlőtumor), MDA-MB-453 (humán emlőtumor), SKBR-3 (humán emlőtumor). A HaCaT kivételével (melyet a Debreceni Egyetem Élettani Intézetétől kaptunk) a sejtvonalakat az American Type Culture Collection-től szereztük be (ATCC, Manassas, VA).

A sejteket specifikációjuknak megfelelően tenyésztettük: 10% embrionális borjú szérumot (FCS) és 50 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM médiumban, 37°C-os hőmérsékleten, 5% szén-dioxid jelenlétében. Mivel az említett sejtvonalak letapadóak, ezért azokat tripszin-EDTA oldattal választottuk fel a tenyésztő edény aljáról. Western blot vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az F1-4 sejtek esetén a tripszinezés nem befolyásolja a sejtfelszíni EGFR mennyiségét (7. ábra).

A kísérletek során a mosási, sejtkoncentráció beállítási lépésekkor 290 RCF sebességgel 5 percig centrifugáltuk a sejteket.

Azon kísérleteket megelőzően, ahol EGF stimulálást is végeztünk, a sejteken 12 órán át szérummegvonást alkalmaztunk, azaz 0,1% FCS-t és 50 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM médiumban történt a tenyésztés.

Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata során szükséges volt a sejteket csökkentett oxigén jelenlétében tenyésztetni. Ehhez a 8 lyukú Ibidi kamrában vagy a sejttenyésztő flakóban növesztett sejteket Billups-Rothenberg moduláris hypoxiás kamrába (San Diego, CA) tettük, majd hypoxiás gázkeverékkel (Linde, München, Németország) gázosítottuk, melynek összetétele: 1% O₂, 5% CO₂ és 94% N₂. A gázt 25 L/ perc áramlási sebességgel 4 percig áramoltattuk keresztül a kamrán, majd lezártuk és 37°C-os termosztátba helyeztük, ahol 4 napig inkubáltuk.



7. ábra: A tripszinezés hatása az F1-4 sejteken kifejeződő EGFR mennyiségére

Az F1-4 sejteket lizáltuk (1-es minta), vagy a lizálást megelőzően tripszin-EDTA oldattal történő kezelésnek vetettük alá (2-es minta). A fehérjéket 7%-os poliakrilamid gélen választottuk el molekulatömeg alapján, majd PVDF membránra blottoltuk. Elsődleges antitestként EGFR-ellenes (F4-es klón, Sigma

Aldrich), vagy kontrollként aktin-ellenes (AC40-es klón, Sigma Aldrich) antitesteket használtunk. A másodlagos antitesttel történő inkubáció után egy peroxidáz előhívó kit segítségével tettük láthatóvá a fehérjesávokat. A blot melletti számok a molekulatömegeket adják meg kDa mértékegységben. A western blot részletesebb protokollja a 4.14.1-es alfejezetben olvasható.

4.3. EGFR expressziós szint meghatározása

Az EGF kötődésének vizsgálata során használt sejtvonalak által expresszált EGFR kvantitatív meghatározásához indirekt immunfluoreszcens jelölést végeztünk. A feltripszinezett A431 és F1-4 sejteket 0,5 mg/ml BSA tartalmú PBS pufferben felvettük 10 millió/ml sejtsűrűségben. Elsődleges antitestként az EGFR-ellenes Mab-528-at használtuk, amit a HB-8509 hibridóma (ATCC) felülűszojából tisztítottunk. Másodlagos antitestként AlexaFluor-647-GAMIG-t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) alkalmaztunk. A kalibrációhoz DAKO Qifikit-et (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) használtunk, ami több, ismert mennyiségű elsődleges antitesttel ellátott gyöngy-populációból áll. Ezeket ugyanúgy megjelöltük az AlexaFluor-647-GAMIG másodlagos antitesttel, mint a sejteket. Az egyes gyöngy-populációkra kapott fluoreszcenciaintenzitások alapján kalibrációs egyenest vettünk fel, mely segítségével meghatározhatóvá válik a sejtekhez kötődött antitest mennyisége, így a receptorszám. A fluoreszcenciaintenzitás mérés FACS Aria III áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA) történt. Az így kapott eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

Sejtvonal	receptor/sejt
F1-4	560 000
A431	690 000

1. táblázat: F1-4 és A431 sejtvonalak EGFR expressziója

A sejtfelszíni receptorszám kvantitatív meghatározása DAKO Qifikit kalibrációs gyöngyök segítségével történt, a gyártó utasításait követve. A jelöletlen sejtek fluoreszcenciaintenzitásaival korrigáltuk a jelölt minták esetén mért intenzitásokat.

4.4. Jelölés fluoreszcens EGF-fel és intenzitásmérés áramlási citometriával

Az EGF kötődési vizsgálatokhoz az EGFR ligandumaként tetrametil-rhodaminnal (TAMRA) konjugált EGF-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk, amelyből 10 μ M-os töménységű törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatból hígítási sorozat készült 0,5 mg/ml BSA-PBS pufferben. A jelölő oldatok TAMRA-EGF koncentrációit a 2. táblázat tartalmazza.

A jelölő oldatokat jégen tartottuk, amelyekhez 20 µl térfogatú, 100 000 db sejtet tartalmazó szuszpenzió került egyenként. A TAMRA-EGF-fel történő inkubáció 1 órán át tartott, végig jégen tárolva a mintákat.

A fluoreszcenciaintenzitás méréshez FACS Aria III áramlási citométert használtunk. A TAMRA gerjesztéséhez az 561 nm hullámhosszú lézert használtuk, az emissziót egy 595/50-es sávszűrő segítségével, vagyis az 570-620 nm hullámhossztartományban detektáltuk. A F1-4 sejteken kifejeződő GFP-t 488 nm-en gerjesztettük, emisszióját egy 530/30-as sávszűrő használatával detektáltuk, vagyis az 515-545 nm hullámhossztartományban. A műszer mintatartóját 4°C-on termosztáltuk. A citométerrel mintánként 20 000 db sejtet számoltunk le.

minta sorszáma	EGF koncentráció (pM)	a következő csőből kivett térfogat (µl)	BSA-PBS térfogata (µl)
1	0	0	1 100
2	32	0	1 100
3	64	1 100	1 100
4	128	1 100	1 100
5	256	1 100	1 100
6	512	1 100	1 100
7	1 024	1 100	1 100
8	2 048	1 100	1 100
9	4 096	1 100	1 100
10	8 192	1 100	1 100
11	16 384	1 100	1 100
12	32 768	1 100	1 100
13	65 536	1 100	1 100
14	131 072	28,84 µl TAMRA-EGF törzsoldat	2 171,16

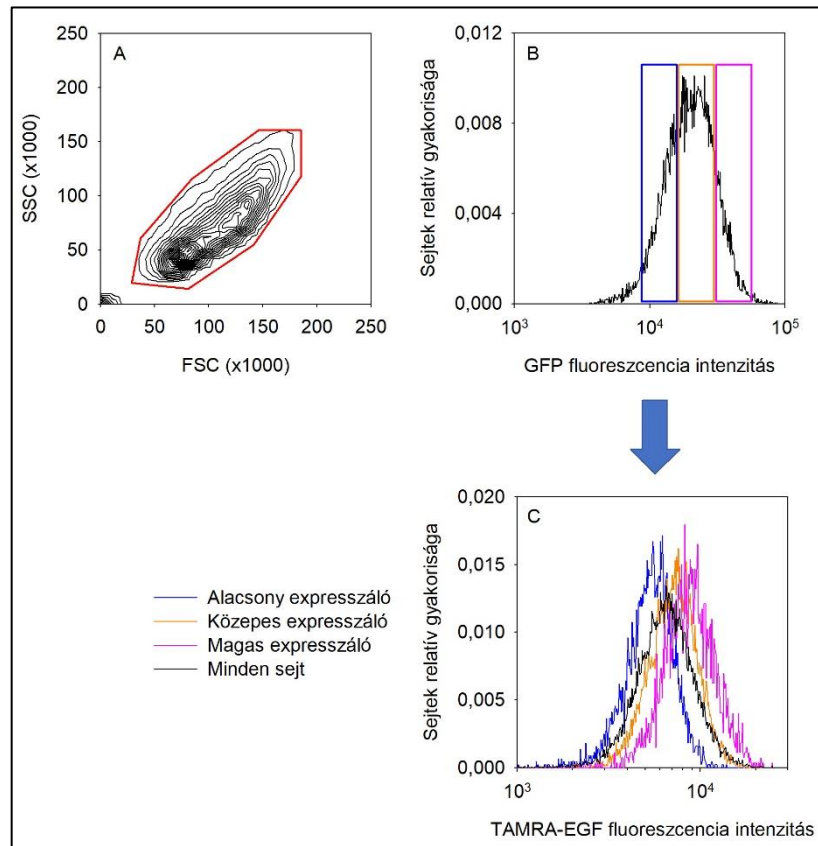
2. táblázat: a TAMRA-EGF jelölő oldatok összetétele

A térfogatok az adott kísérlettől függően változhatnak, a fenti táblázat két mintasoros vizsgálatra elegendő mennyiségeket tartalmaz. A legtöményebb minta (14-es) készül el elsőként és mindegyik oldat a nála kétszer töményebb mintából kerül kihígításra BSA-PBS pufferben. Az egyes mintákhoz 20 µl térfogatú, 100 000 db sejtet tartalmazó 4°C-os szuszpenzió került, a minták végtérfogata 500 µl volt. Számításaink alapján a végtérfogathoz képest kis térfogatban hozzáadott sejtsuszpenzió révén a ligand depléció hatása kivédhető.

4.5. Áramlási citométeres fájlok kiértékelése

Az áramlási citométeres .fcs fájlokat FCS Express szoftverrel (Denovo Software, Thornhill, Ontario, Canada) értékeltük ki. Az FSC-SSC (előre irányú szórás-oldalszórás) kétparaméteres ábrán („dot plot”) az intakt sejteket kiválasztva (8. ábra, A-panel) képeztük azok GFP hisztogramját (8. ábra, B-panel), amelyre három kaput illesztettünk,

szétválasztva ezáltal a sejteket alacsony, közepes és magas EGFR-GFP expresszáló alpopulációkra. Ezután minden minta esetében a négy alpopulációban (alacsony, közepes, magas és teljes sejtpopuláció) külön-külön számítottuk ki a TAMRA intenzitást.



8. ábra: Az áramlási citometriás fájlok kiértékelése

A: A szórásképen az intakt sejtek kijelölése (az ábrán pirossal szerepel), az ezen kívül megjelenő eseményeket a szórásképen sejtörmeléknek tekintettük. B: Az FCS Express szoftver segítségével képeztük minden egyes minta GFP intenzitás-hisztogramját, melyen a sejtek relatív gyakorisága van ábrázolva a GFP intenzitás függvényében. A hisztogramokra három kaput illesztettünk: alacsony (kék), közepes (sárga) és magas (rózsaszín) EGFR expresszáló populációkra osztva a sejteket. C: A négy alpopuláció TAMRA intenzitás-hisztogramja (fekete: minden sejt).

4.6. Illesztés a Hill-modellel

A sejtekhez kötődött EGF mennyiségét (amely megfelel a citométeres mérések során kapott TAMRA intenzitásoknak) a mintákban jelenlévő EGF koncentrációjának ismeretében megillesztettük a Hill-egyenlet logaritmikus formájával:

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{n(\log K_d - \log c)}}, \quad (5)$$

ahol I : a minta fluoreszcenciaintenzitása, I_{\min} és I_{\max} : a legalacsonyabb és a legmagasabb fluoreszcenciaintenzitás, c : a fluoreszcens EGF koncentrációja, n : Hill-együttható és K_d a disszociációs állandó.

Az illesztés Matlab szoftver segítségével történt (Mathworks, Natick, MA), miután a mért fluoreszcenciaintenzitásokat korrigáltuk a háttérrel, vagyis a jelöletlen minta intenzitásával.

A fenti egyenletben a Hill-együttható ad tájékoztatást a látszólagos kooperativitás jellegéről: amennyiben 1 felett alakul, pozitív látszólagos kooperativitás tételezhető fel, míg negatív, ha 1-nél alacsonyabb. A disszociációs konstans a kötődés affinitását jellemzi: minél kisebb értéket vesz fel, annál erősebb a ligandkötés.

4.7. Scatchard diagramok készítése

Annak céljából, hogy a kooperativitást vizuálisan is meghatározhassuk, Scatchard diagramokat készítettünk. Ehhez szükségünk van a sejtekhez kötődött és a szabad EGF koncentráció értékeire. Az áramlási citométeres analízis során a kötött EGF koncentrációját a kapott TAMRA intenzitásának feleltetjük meg, a szabad ligandum mennyisége pedig a mintákhoz adott, ismert TAMRA-EGF koncentráció. Az ábrázolást a 2. ábra szemlélteti. Amennyiben a görbe alulról konkáv, a kooperativitás pozitív, míg felülről konkáv esetben negatív kooperativitás tételezhető fel.

4.8. A fluoreszcens EGF hosszútávú jelenlétének vizsgálata áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával

Vizsgálni kívántuk, hogy a TAMRA-EGF milyen hatást gyakorol a mintákra, ha az általunk általában alkalmazott 1 órás inkubációs időt kibővítjük, ahogy azt több, a témával foglalkozó közleményben láttuk [51], [80]. A TAMRA-EGF-ből hígítási sort készítettünk (lásd 2. táblázat) 0,5 mg/ml BSA-PBS pufferben, amelyet jégen tartottunk. Feltripszinezett, majd a megfelelő sejtsűrűségűre beállított A431 sejteket adtunk az elkészített jelölő oldatokhoz, majd 24 órás inkubáció következett fénytől védve, jégen. A kontroll sejteket szintén jégen, de csak 1 órán át inkubáltuk a ligandummal.

Az áramlási citométeres mérésekhez FACS Aria III áramlási citométert használtunk, a műszer termosztátját 4°C-ra állítva. A TAMRA gerjesztése az 561 nm hullámhosszú lézerrel történt, az emissziót egy 595/50-es sávszűrő segítségével, vagyis az 570-620 nm hullámhossztartományban detektáltuk. Mintánként 20 000 db sejtet számoltunk le a citométerrel.

Annak eldöntésére, hogy a fluoreszcens EGF milyen mértékben jut be a sejtekbe a 24 órás inkubáció során, konfokális mikroszkópos megfigyelést is végeztünk. Az 1 és 24 órán át TAMRA-EGF-fel jelölt A431 sejteket PBS-sel történő mosást követően tárgylemezre cseppentettük, majd Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A lementett képek kiértékelése ezt követően Matlab szoftverrel történt: a sejteket a manuális vízfeltöltéses algoritmussal jelöltük ki, majd az így létrehozott membránmaszkban és azon belül, az intracelluláris térben számítottuk ki a fluoreszcenciaintenzitásokat. Előbbi a sejtmembrán, utóbbi a citoplazma fluoreszcenciaintenzitásának felel meg.

4.9. Sejtek stimulálása EGF-fel

A 12 órán át szérummegvonásban tenyésztett F1-4 sejteket kétszer mostuk 37°C-os HBSS pufferrel, majd az EGF-et (R&D Systems, Minneapolis, MN) 130 nM koncentrációban, HBSS pufferben hígítva adtuk a mintákhoz. Az inkubáció 15 percig tartott, az adott kísérlet protokolljától függően jégen vagy 37°C-os hőmérsékleten.

4.10. A kináz domén funkcionális gátlása kináz inhibitorokkal

I-es típusú tirozin-kináz inhibitoroként az erlotinibet, míg II-es típusú inhibitoroként a lapatinibet választottuk kísérleteinkhez, mindkettőt a Selleckchem-től vásároltuk (Houston, TX). Az inhibitorokból 10 mM-os törzsoldat készült DMSO-ban, majd HBSS pufferben 5 μ M-ra hígítva kerültek a sejtekhez. Az inkubáció 37°C-os hőmérsékleten 1 órán át tartott.

4.10.1. Foszforilált-tirozin származékok immunfluoreszcens jelölése és vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A 8 lyukú kamrában növesztett, erlotinibbel vagy lapatinibbel kezelt F1-4 sejteket EGF-fel stimuláltuk (4.9. fejezet), majd 3,7% (m/m) formaldehid-PBS oldattal fixáltuk és 0,1% (v/v) Triton-X-PBS pufferrel permeabilizáltuk. A foszforilált tirozinokat PY99 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) jelöltük, melyet AlexaFluor-647 GAMIG másodlagos antitesttel tettünk detektálhatóvá. Az utolsó, 0,5 mg/ml BSA-PBS-sel történő mosás után a mintákat Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. 488 nm-es gerjesztést használtunk a GFP detektálásához és 633 nm-es lézert az indirekt jelölt foszfo-tirozinok vizsgálatára, az előbbi emisszióját a 493-598, utóbbiét a 645-745 nm hullámhossztartományban detektáltuk.

4.11. Az EGFR dimerizációjának vizsgálata homo-FRET mérésel

F1-4 sejteket 8 lyukú, fedőlemez aljú Ibidi kamrába tettünk 50 000 db sejt/lyuk koncentrációban. A kísérletet megelőzően a sejteken 12 órán át szérummegvonást alkalmaztunk (lásd 4.2. fejezet), majd 37°C-os HBSS pufferrel kétszer mostuk a mintákat. Ezután azokat erlotinibbel és lapatinibbel kezeltük (lásd 4.10. fejezet), majd 130 nM EGF-fel stimuláltuk jégen vagy 37°C-on 15 percig. A sejteket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk anélkül, hogy mostuk vagy hígítottuk volna a mintákat. Nagy figyelmet fordítottunk arra, hogy a képek felvétele alatt se változzon meg jelentősen a kísérleti rendszer hőmérséklete, így két minta vizsgálata között az adott kamrát mindig 37°C-os termosztátba vagy jégre tettük. A GFP-t 405 nm hullámhosszú lézerrel, egymást követő besugárzási lépésekkel fotoelhalványítottuk („bleach-eltük”) a szignál teljes eltűnéséig. Az emissziót két csatornában detektáltuk: az egyikben a gerjesztő fényvel párhuzamos (I_{\parallel}), míg a másikban az arra merőleges (I_{\perp}) polarizációjú fényt regisztráltuk.

4.11.1. Kiértékelés

Matlab szoftverben, a vízfeltöltéses algoritmust használva kijelöltük a sejteket, majd a membrán pixelek intenzitásait egy sejt nélküli terület intenzitásával korrigáltuk. Az anizotrópiát (r) az alábbi képlettel számítottuk ki:

$$r = \frac{I_{\parallel} - G I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 G I_{\perp}}, \quad (6)$$

ahol I_{\parallel} : a gerjesztő fényvel párhuzamosan polarizált emittált fény, I_{\perp} : a gerjesztő fényre merőlegesen polarizált emittált fény és G egy korrekciós faktor, amely a detektor és az optikai komponensek (szűrők, lencsék, stb.) eltérő érzékenységét jellemzi a két különböző polarizációjú fénykomponensre. A G faktor meghatározása minden kísérlet esetén úgy történt, hogy a GFP festék törzsoldatból 1 mM koncentrációjú oldatot készítettünk HBSS pufferben, amiről a többi minta esetén használt mikroszkópos beállításokkal vettünk fel képeket. A polarizált gerjesztés ellenére az I_{\parallel} és a I_{\perp} intenzitáskomponenseknek a GFP gyors rotációs mozgása miatt egyenlőknek kell lenniük. A gyakorlatban, a detektor és egyéb optikai komponensek horizontálisan és vertikálisan polarizált komponensekre vonatkozó eltérő transzmissziója miatt azonban ezen két intenzitáskomponens mért értéke mégsem lesz egyenlő. A két intenzitás hányadosa adja meg a G faktort, tehát a mikroszkóp relatív érzékenységét a kétféle polarizációjú fényre.

4.12. Az EGF kötődés kinetikai vizsgálata áramlási citometriával

A tripszinezett F1-4 sejteket PBS-sel mostuk, majd a sejtkoncentrációt 1,5 millió/ml-re beállítva szortercsővekbe pipettáztuk. A TAMRA-EGF-et 1, 10 és 100 nM koncentrációban adtuk a jégen tartott sejtekhez, majd FACS Aria III áramlási citométeren mértük a TAMRA intenzitásának változását, mintánként 20 percen át. A citométer mintatartójának hőmérsékletét 4°C-ra állítottuk. Az így kapott .fcs fájlok a mérési időt is tartalmazzák, így lehetővé vált a sejtekhez kötődött fluoreszcens EGF mennyiségének időbeli vizsgálata.

4.13. Az F-aktin depolimerizációja latrunculin-B-vel

A latrunculin-B-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mely depolimerizálja a citoskeleton egyik alkotórészét, az F-aktint [81], 2 μ M koncentrációban adtuk az F1-4 sejtekhez HBSS oldatban. A kezelés 37°C-os hőmérsékleten 10 percig tartott. A sejteket ezután előkészítettük a következő kísérleti lépéshez, amely az EGF kötődés vizsgálata (lásd 4.4. fejezet) vagy az F-aktin fluoreszcens jelölése és konfokális mikroszkópos megfigyelése (lásd 4.13.1. fejezet). Előbbi esetben a sejteket tripszineztek és PBS-sel mostuk, majd a megfelelő sejtkoncentrációjú szuszpenzióhoz adtuk a toxint, utóbbi esetben a 8 lyukú kamrában növesztett F1-4 sejtek mosását követően került a mintákra a latunculin-B.

A kísérletek során kontrollként jasplakinolidot (Sigma-Aldrich) használtunk, mely a latrunculin-B-vel ellentétes hatással rendelkezik, mivel az aktin polimerizációját elősegíti [82]. A toxinnal 1 μ M-os koncentrációban, 37°C-on 30 percig kezeltük a sejteket.

4.13.1. F-aktin jelölése és vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett és latrunculin-B-vel kezelt sejteket PBS-sel mostuk, majd aceton hozzáadásával szobahőmérsékleten permeabilizáltuk. Az aktin vizsgálatához a gyilkos galóca (*Amanita phalloides*) toxinjaként ismert falloidint használtuk, amely rendelkezésünkre állt TRITC (tetrametilrhodamin B izotiocianát) festékkel konjugált formában (Sigma-Aldrich). A TRITC-falloidinnal 4 μ g/ml koncentrációban jelöltük a sejteket 20 percig szobahőmérsékleten. A sejtmag jelölésére DAPI-t (Sigma-Aldrich) használtunk 10 μ g/ml koncentrációban. A megjelölt sejteket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a DAPI-t 405 nm-en, a TRITC-t

543 nm-en gerjesztettük, előbbi emisszióját a 410-482, utóbbiét az 557-655 nm hullámhossztartományban detektáltuk.

4.14. Az EGFR glikozilációjának gátlása tunicamycinnel

A tunicamycint (Sigma-Aldrich), a fehérje N-glikozilációját gátló ágenszt 1 µg/ml koncentrációban adtuk az F1-4 sejtekhez DMEM médiumban, ami a 4.2-es fejezetben leírtak szerint készült. A toxin jelenlétében 24 órán át tovább tenyésztettük a sejteket 37°C-os hőmérsékleten. Ezután vizsgáltuk a kezelt sejtek EGF kötését (lásd 4.4. fejezet) vagy az EGFR molekulatömegét a következő pontban leírtak szerint.

4.14.1. *Az EGFR kimutatása western blot-tal*

A 9 cm² felületű petricsészében tenyésztett, tunicamycinnel kezelt sejteket proteáz inhibitor tartalmú lízispufferrel lizáltuk, majd a denaturáló puffer hozzáadását követően 10 percig 98°C-on tartottuk.

A sejtlizátumok azonos térfogatait 7%-os SDS-poliakrilamid géltre vittük fel, majd elektroforetikus szétválasztottuk a fehérjéket molekulatömeg szerint. Az elektroforézist követően a fehérjéket Immobilon-P PVDF membránra (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) blottoltuk. Ezután a membránt 5 % (w/v) tejpport és 0,1% (v/v) Tween-20-at tartalmazó TBS oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán át.

Az elsődleges antitestet (anti-ErbB1 klón: F4; Sigma-Aldrich) 1% (w/v) tejpport tartalmú Tween-TBS-ben adtuk a membránhoz 1:1500 hígításban és éjszakán át, 4°C-on rajta tartottuk. Az ezt követő Tween-TBS-sel történő mosások után került a másodlagos antitest a membránra (GAMIG-peroxidáz; Sigma-Aldrich) 1:5000 hígítással, 1% (w/v) tejpport tartalmú Tween-TBS-ben.

A két órás inkubációt követően a membránt mostuk, majd a fehérje sávokat peroxidáz előhívó kit-tel (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Fisher Scientific) tettük láthatóvá.

4.15. Az elisidepsinre vonatkozó félhatásos gátló koncentrációk meghatározása, valamint sejtekhez kötődésének vizsgálata konfokális mikroszkópiával

Az elisidepsinre (PharmaMar, Madrid, Spanyolország) vonatkozó félhatásos gátló koncentrációkat normoxiában és 4 napon át hypoxiában tenyésztett sejt kultúrákon határozta meg munkacsoportunk, a kutatásba való becsatlakozásomat megelőzően.

A 96 lyukú plate-eken tenyésztett sejteket 30 percen át kezelték az elisidepsinnel, ami után további 3 napig, a megfelelő gázkörnyezetben inkubálták őket. Az életképesség meghatározáshoz WST-1 reagenst (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) használtak, a gyártó által meghatározott protokollt követve. A minták abszorbanciáját 450 és 620 nm-en mérték ELISA reader segítségével, majd a mérési pontokat a Hill-egyenlettel illesztették.

Az így kapott IC₅₀ értékek ismeretében (lásd 7. táblázat) a mikroszkópos kötődéses vizsgálatokhoz az A431 és SKBR-3 sejtvonalakat választottuk, mivel várakozásunk szerint a hypoxia az A431 sejtvonalnál csökkenti a gyógyszerrel szembeni érzékenységet, míg az SKBR-3 sejtek szenzitivitására kevésbé lesz hatással. A 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett sejteket hypoxiás gázkeverékkel elgázosítottuk (lásd 4.2. fejezet), majd 4 napig ebben a környezetben tenyésztettük 37°C-on. Kontrollként A431 és SKBR-3 sejteket 8 lyukú Ibidi kamrában, normoxiás gázkörnyezetben, 37°C-on tenyésztettünk.

A PBS pufferrel történő mosást követően a mintákat jégre tettük, majd kezeltük a gyógyszermolekula két változatának elegyével: OregonGreen488-nel jelölt és jelöletlen elisidepsin 1:4 arányban, 2 µM végkoncentrációban. A kétperces kezelés után a mintákat mostuk, majd Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, a fluorofórt a 488 nm-es lézerrel gerjesztettük és emisszióját a 493-598 nm hullámhossztartományban detektáltuk.

4.16. Az elisidepsin sejtekhez történő kötődésének vizsgálata áramlási citometriával

Az elisidepsin hatását a vizsgált sejtszám növelése -és így a statisztika megbízhatóságának javítása- érdekében áramlási citométerrel is vizsgáltuk. A 25 cm² felületű sejtenyésztő flakóban növesztett MCF7, MDA-MB-453, SKBR-3, A431, HeLa, HaCaT és CHO sejteket hypoxiás gázeleggyel gázosítottuk (lásd 4.2. fejezet), majd 4 napig ebben a környezetben tenyésztettük 37°C-on. A kontroll (normoxiás környezetben, 37°C-on tenyésztett) és a hypoxiás sejteket tripszinezttük, majd PBS-sel mostuk. A gyógyszer két változatát együttesen alkalmaztuk: OregonGreen488 festékkel konjugált és jelöletlen elisidepsin 1:4 arányú elegye, 0,5 µM végkoncentrációban. A kezelés jégen történt, majd FACS Aria III áramlási citométeren mértük a minták OregonGreen488 fluoreszcenciaintenzitását, amelyet 488 nm-en gerjesztettünk és emisszióját egy 530/30-

as sávszűrő segítségével, vagyis az 515-545 nm hullámhossztartományban detektáltuk. Az eredményül kapott .fcs fájlokat FCS Express szoftver segítségével értékeltük ki.

4.17. Az elisidepsin koncentrációfüggő kötődésének és sejtmembrán-permeabilizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával

8 lyukú Ibidi kamrában növesztett A431 sejteket elisidepsinnel (OregonGreen488 festékkel konjugált és jelöletlen elisidepsin 1:4 arányú elegyével) kezeltünk 6 különböző koncentrációban: 0,36 -1- 2,5- 5-10 és 44 μM . Minden mintához propidium-jodid is került 10 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban a halott sejtek detektálása céljából. A húszperces kezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az OregonGreen488 festéket 488 nm-en gerjesztettük, emisszióját a 493-598 nm hullámhossztartományban detektáltuk, míg a propidium-jodidot 543 nm-en gerjesztettük és emisszióját az 557- 655 nm hullámhossztartományban vizsgáltuk.

A képek elemzése DipImage szoftver segítségével történt (Delft University of Technology, Delft, Hollandia), Matlab programban futtatva. A membránhoz kötődött fluoreszcens elisidepsin intenzitásának meghatározásához a vízfeltöltéses algoritmussal jelöltük ki a sejteket, majd az így kapott membránmaszkban számítottuk ki az intenzitást, melyet egy sejtmentes terület kijelölésével, vagyis a háttérrel korrigáltunk. Az így kapott intenzitásokat és a propidium-jodid pozitív sejtek arányát a hozzáadott elisidepsin koncentrációjának függvényében külön-külön ábrázoltuk és a Hill-egyenlettel illesztettük Matlab programban, ahogy az a 4.6. fejezetben bemutatásra került.

4.18. Statisztikai elemzés

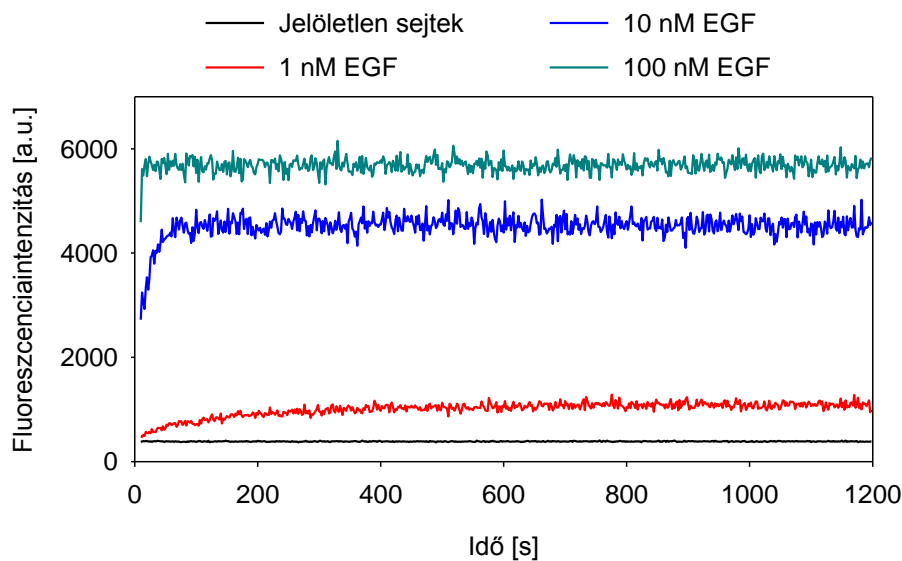
Az ábrákon a mérési pontok átlaga $\pm\text{SD}$ (helyenként SEM) került ábrázolásra. A statisztikai elemzésekhez Student-féle t-tesztet vagy kétszemponos variancia analízist (ANOVA, two-way analysis of variance) használtunk, utóbbit Tukey-féle HSD teszttel kiegészítve. Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol $p < 0,01$ volt.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az EGF sejtekhez kötődésének kinetikája és hosszútávú jelenlétének hatása a látszólagos kooperativitásra

A kvantitatív EGF kötődési kísérleteink során a TAMRA-EGF-fel 1 órán keresztül inkubáltuk a sejteket jégen, mivel feltételezésünk szerint ez idő alatt beáll a kötődés egyensúlya, ugyanakkor még nem jut be a fluoreszcens ligandum az intracelluláris térbe. Azonban az irodalomban ettől eltérő kísérleti kondíciók mellett is végeztek hasonló, ligandkötési kooperativitást célzó vizsgálatokat [51], [80].

Az EGF kötődés kinetikai vizsgálata során F1-4 sejteket jelöltünk a TAMRA-EGF-fel, három eltérő koncentrációban, majd áramlási citométeren vizsgáltuk a fluoreszcenciaintenzitás időbeli változását. Eredményeink alapján az mondható el, hogy az EGF kötődés egyensúlya 4°C-on kevesebb, mint 1 óra alatt beáll, függetlenül az alkalmazott ligandum koncentrációjától (9. ábra).



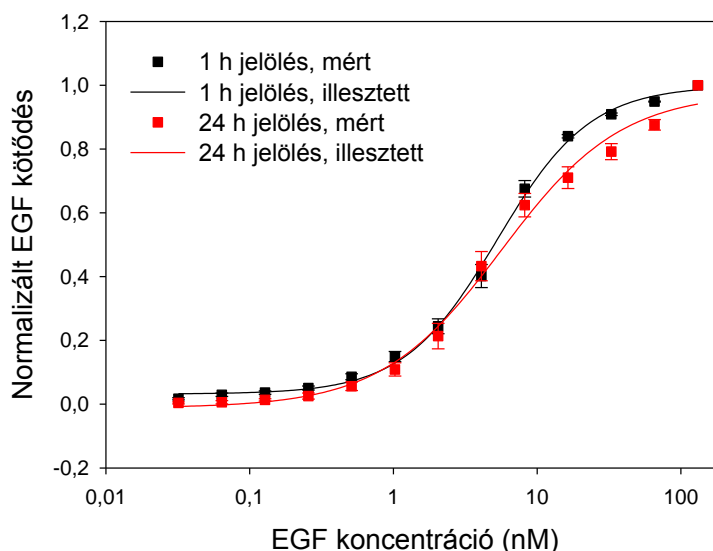
9. ábra: F1-4 sejtek TAMRA-EGF kötődésének kinetikai vizsgálata

A minták sejtkoncentrációját 1,5 millió/ml-re állítottuk, majd a TAMRA-EGF hozzáadását követően azonnal FACS Aria III áramlási citométeren mértük a minták intenzitását legalább 20 percen át. A műszer mintatartójának hőmérsékletét 4°C-ra állítottuk és a kísérleti adatok exportálásánál a mérési időt is lementettük. A fluoreszcenciaintenzitásokat 5 másodperces időablakokban átlagoltuk. Látható, hogy 1, 10 és 100 nM hozzáadott EGF koncentráció esetén egyaránt beáll a kötődés egyensúlya, az általunk alkalmazott 1 órás inkubációnál lényegesen hamarabb.

Az EGF hosszútávú jelenlétének vizsgálatához A431 sejteket inkubáltunk a TAMRA-EGF-fel 24 órán keresztül, 4°C-os hőmérsékleten. Ezzel azt kívántuk vizsgálni,

hogy ennyi idő alatt észlelhető-e a ligandum bekerülése az intracelluláris térbe és a látszólagos kooperativitásra ez hatást gyakorol-e.

Áramlási citométeres vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy a 24 órán át fluoreszcens EGF-fel inkubált sejtek ligandkötésének látszólagos kooperativitása lecsökkent (10. ábra, 3. táblázat).



10. ábra: 1 és 24 órán át TAMRA-EGF-fel jelölt A431 sejtek kvantitatív EGF kötődési vizsgálata

A TAMRA-EGF-ből készült hígítási sorozattal 1 órán át inkubált sejtek fluoreszcenciaintenzitásait áramlási citometriával mértük, a minták mosása vagy hígítása nélkül. A fluoreszcenciaintenzításokat a legmagasabb értékre normáltuk mindkét mintasor esetén. Eredményeinket a Hill-egyenlettel illesztettük. A kísérletet háromszor, egymástól függetlenül hajtottuk végre, melyek átlaga, illetve az azokhoz tartozó középérték közepes hibája (SEM) került ábrázolásra.

Az illesztés alapján megállapítható, hogy az egy napon át ligandummal inkubált sejtek EGF kötésének kooperativitása és affinitása egyaránt lecsökkent.

Kezelés	n	K_d (nM)
Kontroll	$1,32 \pm 0,02$	$4,75 \pm 0,54$
24 h TAMRA-EGF	$1,02 \pm 0,05$	$5,2 \pm 1,11$

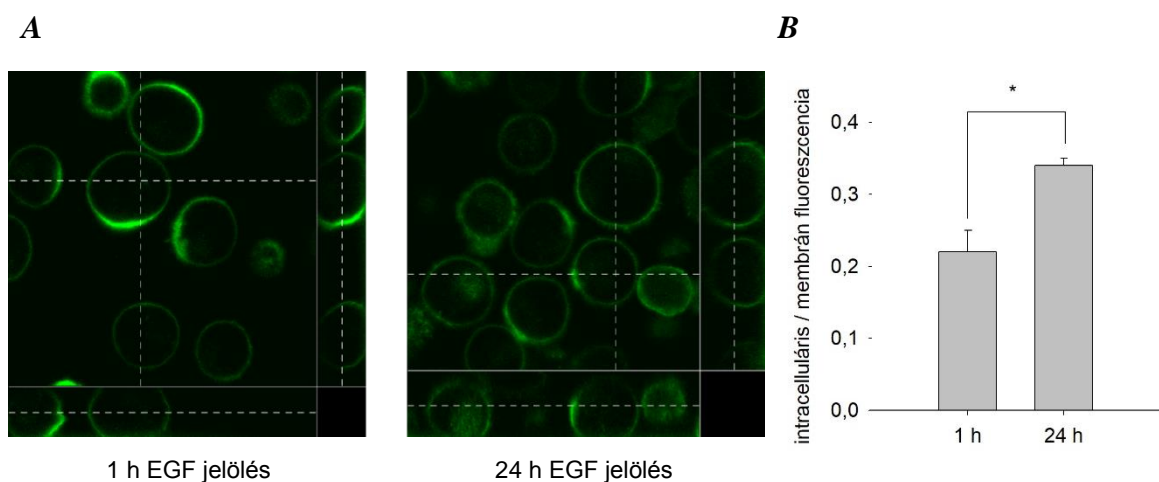
3. táblázat: 1 és 24 órán át TAMRA-EGF-fel jelölt A431 sejtek EGF kötődésének látszólagos kooperativitása és affinitása

A mérési pontok Hill-egyenlettel történő megillesztésének eredményei, n a Hill-koefficiens, K_d a disszociációs konstans jelöli. A táblázatban három mérés során kapott paraméterek átlaga, valamint a hozzájuk tartozó SD értékek szerepelnek.

Konfokális mikroszkópos felvételeink arra mutattak rá, hogy az egy napon át megjelölt sejtekbe bejut a fluoreszcens ligandum, internalizáció vagy diffúzió útján. Ennek következtében a membránhoz kötődött EGF mennyisége nem meghatározható, hiszen a membrán és az intracelluláris fluoreszcencia elkülönítésére az áramlási citometria során nincs lehetőség. Ezért az így kapott látszólagos kooperativitás és affinitás

is megbízhatatlan. A kontroll mintasornál azonban (ahol 1 óráig tartó inkubációs időt alkalmaztunk jégen) nem láthatunk intracelluláris fluoreszcens szignált, megerősítve az EGF kötődés kísérleti beállításunk megbízhatóságát.

Szerettük volna kvantitatívan is kiértékelni a konfokális mikroszkópia során látottakat, így Matlab szoftverben a vízfeltöltéses algoritmus segítségével azonosítottuk a sejtek membránját, majd további algoritmusok használatával kiszámítottuk a képeken látható sejtek intracelluláris és membrán fluoreszcenciaintenzitásait (11. ábra). Ábrázolva az előbb említett két paraméter hányadosát az állapítható meg, hogy a 24 órán át TAMRA-EGF-fel inkubált sejtek intracelluláris fluoreszcenciájának aránya magasabb, mint a kontroll sejteké.



11. ábra: 1 és 24 órán át TAMRA-EGF-fel jelölt A431 sejtek konfokális mikroszkópos analízise

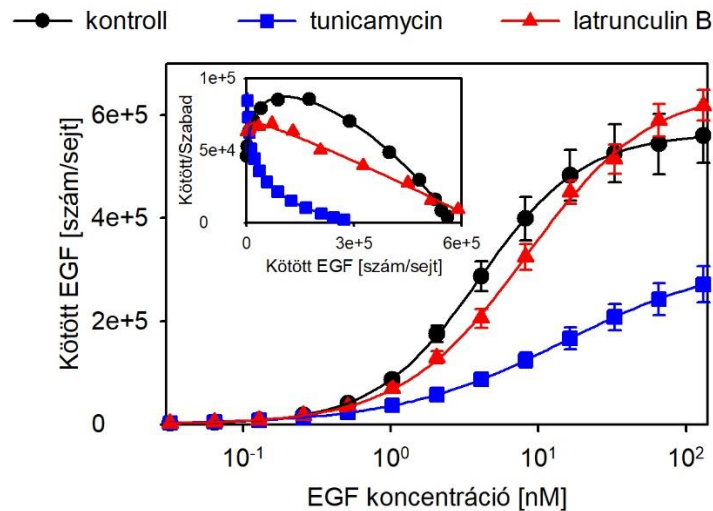
Mikroszkópos vizsgálatainkhoz a kötődés kísérletekkor alkalmazott legmagasabb koncentrációjú TAMRA-EGF-fel (130 nM) inkubált mintákat vettük figyelembe. Az A-panelen a felvételek ortogonális nézetei láthatóak. B-panel: Kiszámítottuk az egyes felvételeken a sejtek intracelluláris és membrán fluoreszcenciaintenzitásait, majd a kettő hányadosát ábrázoltuk, feltüntetve a középérték közepes hibáit is (SEM). Mind az 1, mind a 24 órán át kezelt sejtekről legalább 5-5 konfokális felvétel került kiértékelésre, a kísérletet pedig kétszer, egymástól függetlenül hajtottuk végre. Az intenzitás hányadosok különbsége szignifikáns (Student-féle t-teszt, * $p < 0,01$).

5.2. Az EGFR glikozilációjának hatása az EGF kötődés látszólagos kooperativitására

Kísérleteink során az EGFR megfelelő glikoziláltságának szerepét is vizsgáltuk az EGF kötődés látszólagos kooperativitására és affinitására. A tunicamycin egy olyan ágens, amely a fehérjék N-glikozilációját gátolja meg [83], [84]. A tunicamycinnel kezelt F1-4 sejtek EGF kötődését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a kötődés látszólagos kooperativitása és affinitása egyaránt lecsökkent a kezeletlen mintasorhoz képest (lásd

12. ábra és 4. táblázat). Megjegyezzük, hogy mivel a tunicamycin egy általános glikoziláció-gátló anyag, nem pedig specifikusan csak az EGFR érését akadályozza, az általunk kimutatott hatáshoz egyéb jelenlévő fehérjék elégtelen glikozilációja is hozzájárulhat.

Az EGFR tunicamycin általi sikeres deglikozilációját western blottal is sikerült alátámasztani, ugyanis a kontroll sejteknél látott receptor molekulatömeg a kezelés következtében lecsökkent (13. ábra).



12. ábra: Az EGFR deglikozilációjának és az aktin depolimerizációjának hatása az F1-4 sejtek EGF kötésére

A 24 órán át tunicamycinnel (1 µg/ml), vagy 10 percig latrunculin-B-vel (2 µM) kezelt sejteket adott koncentrációjú TAMRA-EGF-fel inkubáltuk, majd fluoreszcenciaintenzitásaikat áramlási citométeren mértük, a minták mosása vagy hígítása nélkül. Minden mintasor esetén az intenzitásokat a legmagasabb értékre normáltuk, majd eredményeinket a Hill-moddal illesztettük. A kísérlet legalább háromszori elvégzése során kapott mérési pontok átlaga, valamint a vonatkozó SEM értékek kerültek ábrázolásra. Az ábra bal felső sarkában egy reprezentatív Scatchard diagram látható.

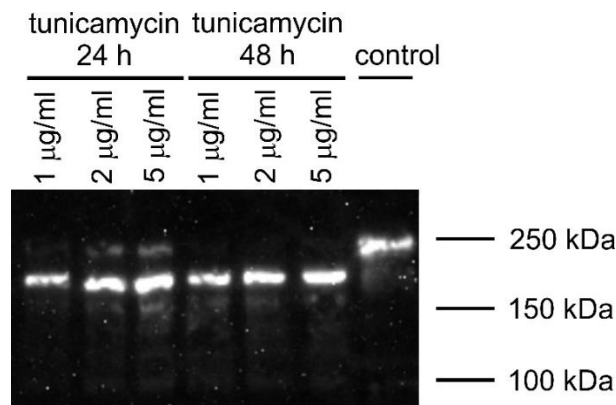
Megállapítható, hogy mind a tunicamycin, mind a latrunculin-B kezelés lecsökkentette az EGF kötődés látszólagos kooperativitását és affinitását.

5.3. A citoszkeleton polimerizációjának hatása az EGF kötődés látszólagos kooperativitására

Felmerült az EGFR membránkörnyezetének, azon belül is az aktinhoz történő kihorgonyzódásának befolyásoló szerepe a receptor funkciójára. A latrunculin-B az F-aktin polimerizációját gátolni képes anyag [81], melynek az EGF kötődés látszólagos kooperativitására gyakorolt hatását F1-4 sejteken kívántuk vizsgálni. A toxinnal előkezelt sejtek EGF kötődésének látszólagos kooperativitása és affinitása egyaránt lecsökkent a

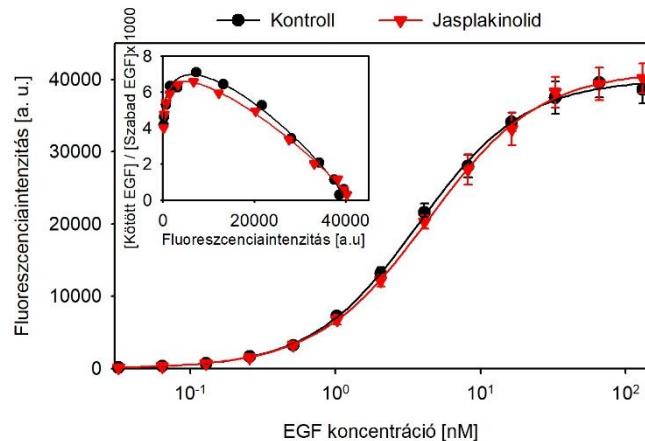
kezeletlen sejtekhez képest (lásd 12. ábra és 4. táblázat). Pozitív kontrollként jasplakinoliddal kezeltünk sejteket, mely a latrunculin-B-vel ellentétes hatással rendelkezik, azaz az F-aktin polimerizációját elősegíti [82]. A jasplakinoliddal kezelt F1-4 sejtek EGF kötési görbéje és Scatchard ábrázolása a 14. ábrán látható.

A két ágens mikrofilamentumokra kifejtett hatását konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal is alá kívántuk támasztani, ezért 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett sejteket latrunculin-B-vel és jasplakinoliddal kezeltünk, majd a sejtmembrán permeabilizációját követően az F-aktint TRITC-falloidinnel jelöltük. Eredményeink szerint a latrunculin-B hatékonyan depolimerizálja az F-aktint, ugyanakkor a jasplakinolidnak nem volt észlelhető hatása a mikrofilamentumok mennyiségére (15. ábra).



13. ábra: A tunicamycin deglikozilálja az EGFR-t, ami következtében a molekulatömeg lecsökken

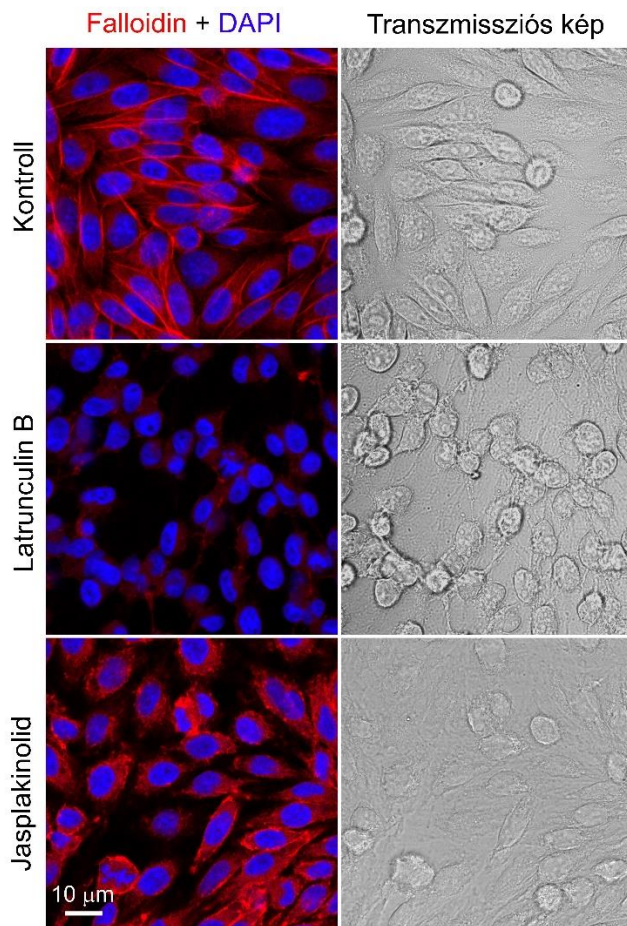
F1-4 sejteket kezeltünk tunicamycinnel a feltüntetett koncentrációban, 24 vagy 48 óráig. A fehérjét 7%-os poliakrilamid gélen választottuk szét molekulatömeg szerint. A receptort anti-ErbB1 F4 elsődleges, majd GAMIG-peroxidáz másodlagos antitesttel jelöltük meg. A fehérjesávokat peroxidáz előhívó kit-tel tettük láthatóvá. Megállapítható, hogy minden vizsgált kísérleti kondíció alkalmazásával sikerült elérnünk a deglikozilációt, mivel a molekulatömeg ~180 kDa-ra csökkent, míg a kontroll mintában az EGFR ~210 kDa.



14. ábra: A jasplakinolid hatása az F1-4 sejtek EGF kötésére

Az 1 μM koncentrációban, 30 percen át tartó jasplakinolid kezelés nem változtatta meg a sejtek egyensúlyi EGF kötésének látszólagos kooperativitását és affinitását.

A kísérletet legalább háromszor, egymástól függetlenül hajtottuk végre és a mérési pontok átlaga, illetve az azokhoz tartozó SD értékek kerültek ábrázolásra. Az ábra bal felső sarkában egy reprezentatív Scatchard diagram látható.



15. ábra: A latrunculin-B és a jasplakinolid hatása az aktin filamentumok szerveződésére

A 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett F1-4 sejteket 2 μM latrunculin-B-vel 10 percig, vagy 1 μM jasplakinoliddal 30 percig kezeltük. Ezután a sejtek membránját acetonnal tettük átjárhatóvá, amelyet a TRITC-falloidin és a DAPI hozzáadása követett: előbbi 4 $\mu\text{g/ml}$, utóbbit 10 $\mu\text{g/ml}$ -es töménységben alkalmaztuk. A falloidin az F-aktinhoz, míg a DAPI a sejtmaghoz kötődik. Az ábrán a fluoreszcenciás felvételek átfedései, valamint a transzmissziós képek láthatóak. A méretjelzés mind a három kezelési körülményre vonatkozik.

Kezelés	n	K_d (nM)
Kontroll	1,24 (1,21 - 1,26)	4 (3,9 - 4,1)
1 μM jasplakinolid	1,13 (1,03-1,23)	4,3 (3,8-4,7)
2 μM latrunculin-B	1,03 (1 - 1,05)	8,2 (7,9 - 8,5)
1 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin	0,77 (0,75 – 0,78)	15 (14,6 – 15,4)

4. táblázat: Az EGF kötődés látszólagos kooperativitásának és affinitásának vizsgálata a receptor deglikoziláció és a citoskeletális struktúra megváltozása esetén

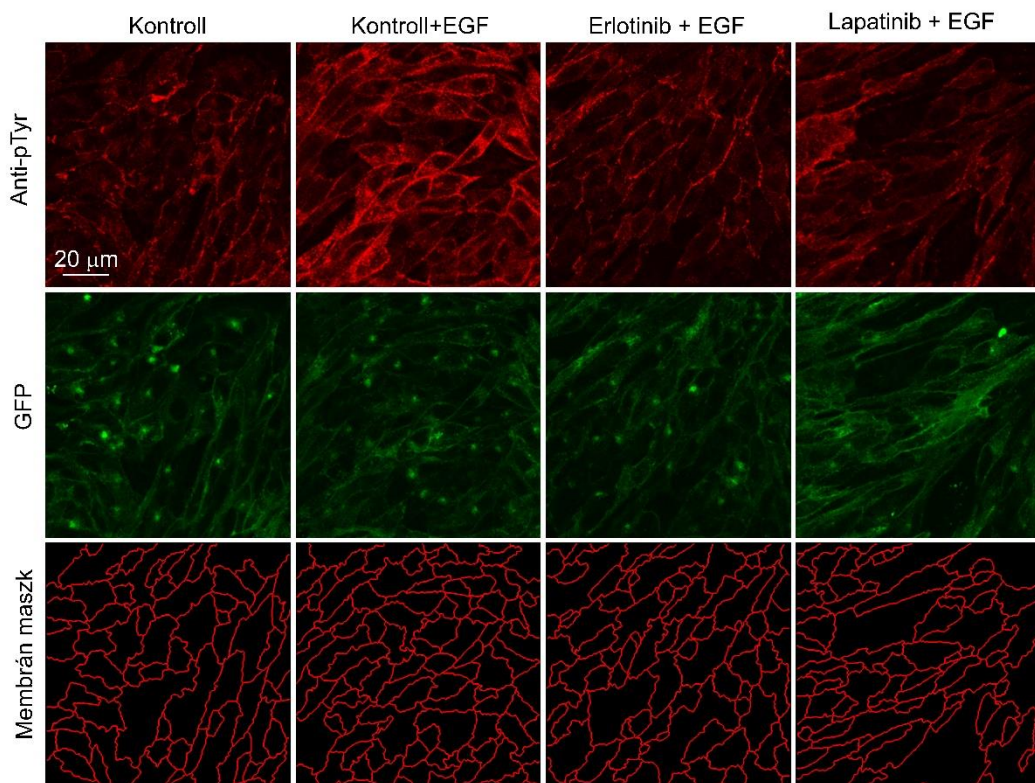
Az 5.2 és 5.3 fejezetekben ismertetett kezeléseknél kapott disszociációs konstansok (K_d), valamint a Hill-együtthatók (n) átlagai szerepelnek a táblázatban. A

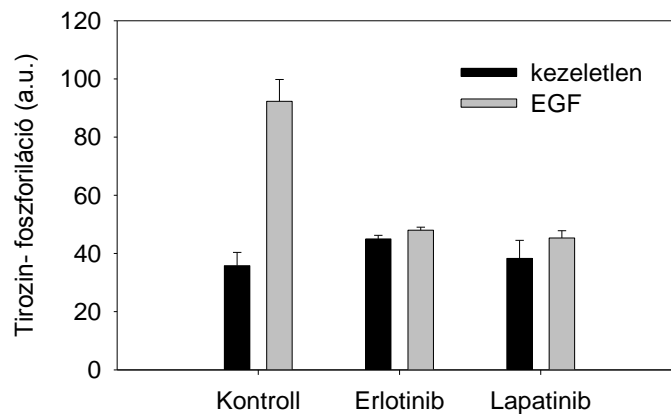
kísérleteket legalább háromszor, egymástól függetlenül hajtottuk végre. A zárójelekben a 95%-os konfidencia intervallumokat tüntettük fel.

5.4. A kináz domén konformációjának és az EGFR expressziójának hatása az EGF kötődésre

Vizsgálataink egy jelentős része annak kiderítésére irányult, hogy az EGFR extracelluláris tirozin-kináz doménjének különböző konformációi milyen hatást gyakorolhatnak a ligandkötésre. A rendelkezésünkre álló tirozin-kináz inhibitorok használatával lehetőségünk volt a kináz egy meghatározott konformációjának stabilizálására: az erlotinib az aktív, ATP-t kötő konformációt stabilizálja, míg a lapatinib éppen az inaktív formához kötődik.

Első lépésként vizuálisan kívántuk megítélni ezen inhibitorok hatását, azaz, hogy az EGF-fel történő stimuláció milyen mértékben váltja ki az EGFR foszforilációját az inhibitorok jelenlétében. Az erről született eredményeinket a 16. ábra szemlélteti.





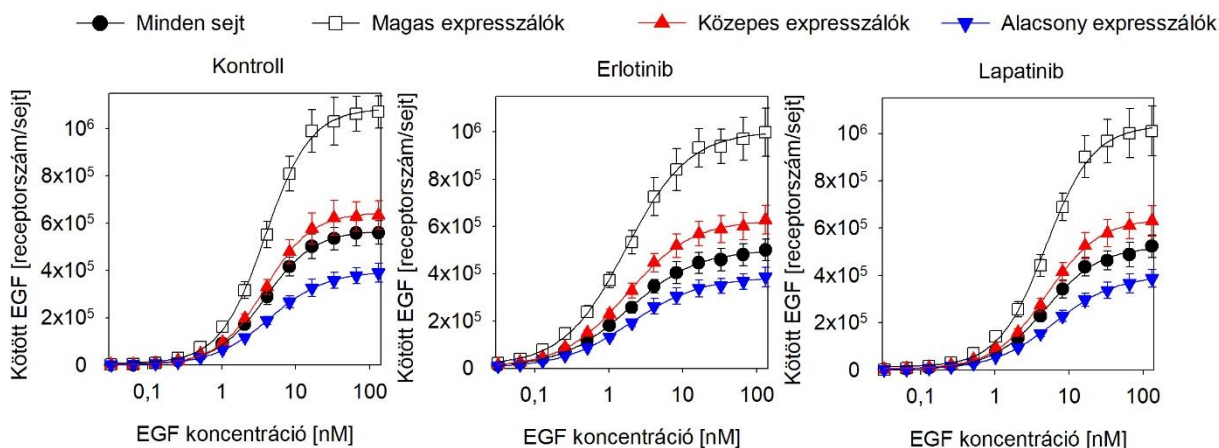
16. ábra: A kináz inhibitorok hatása az EGF-indukálta tirozin- foszforilációra

Felül: A 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett F1-4 sejteken egy éjszakán át szérummegvonást alkalmaztunk, majd erlotinibbel vagy lapatinibbel kezeltük 5 μ M-os koncentrációban 60 percig. Ezután a sejteket EGF-fel stimuláltuk 15 percen át, majd a fixálási és permeabilizálási lépéseket követően egy foszfo-tirozin ellenes antitesttel (PY99), majd az ahhoz kötődő anti-egér IgG-vel (AlexaFluor647 GAMIG) jelöltük a sejteket. A GFP fluoreszcencia az F1-4 sejtek EGFR-GFP expressziójának feleltethető meg. A reprezentatív felvételeken a méretjelzés mind a négy kondícióra vonatkozik.

Alul: A felvételeken a sejtmembránokat a vízfeltöltéses algoritmus manuális változatával jelöltük ki Matlab szoftverben, majd kiszámítottuk az így létrehozott membránmaszkokban a fluoreszcenciaintenzitásokat. Az oszlopdiaagram szemlélteti a három, egymástól független kísérlet alkalmazásával kapott átlagos membránintenzitásokat, illetve a középérték közepes hibáit. Minden mintáról legalább 3 felvétel került kiértékelésre kísérletenként. Az EGF-fel stimulált kontroll minta átlagintenzitása szignifikánsan különbözik az összes többi mintáétól (kétszemponos ANOVA, majd Tukey-féle HSD analízis, $p < 0,01$).

Megállapítottuk, hogy az EGF stimulációnak nincs hatása az EGFR foszforilációjára abban az esetben, ha bármelyik típusú inhibitorral kezeltük a sejteket.

A további vizsgálataink során az inhibitorok EGF kötődésre gyakorolt hatását tanulmányoztuk, nemcsak a kináz aktív vagy inaktív konformációját, hanem a sejtek EGFR expresszióját is figyelembe véve. Az erlotinibbel vagy lapatinibbel előkezelt F1-4 sejteket a fluoreszcens-EGF-et meghatározott koncentrációban tartalmazó jelölő oldatokkal inkubáltuk, az adott inhibitor jelenlétében, majd a fluoreszcenciaintenzitásokat áramlási citométerrel mértük. A szoftveres elemzés során a 8. ábrán bemutatott módon három részre osztottuk a sejteket: alacsony, közepes és magas EGFR expresszáló alpopulációkra, melyekben külön-külön értékeltük ki az EGF sejtekhez történő kötődését. Eredményeinket a 17. ábra és az 5. táblázat szemlélteti.



17. ábra: Kináz inhibitorokkal kezelt F1-4 sejtek egyensúlyi EGF kötése és illesztése a Hill-moddellel

F1-4 sejteket 5 μM erlotinibbel vagy lapatinibbel kezeltünk elő 1 órán át 37°C-on. A TAMRA-EGF-ből készült hígítási sorozattal 1 órán át inkubált sejtek fluoreszcenciaintenzitásait áramlási citometriával mértük az inhibitor jelenlétében, a minták mosása vagy hígítása nélkül. Eredményeinket a Hill-egyenlettel illesztettük, minden alpopulációt külön-külön. A kísérletet háromszor, egymástól függetlenül hajtottuk végre, és a mérési pontok átlaga, illetve az azokhoz tartozó SEM értékek kerültek ábrázolásra.

	alacsony expresszálók	közepes expresszálók	magas expresszálók	teljes sejtpopuláció
kontroll	$n=1,140\pm 0,004$ $K_d=4,40\pm 0,01$ nM N=390 000	$n=1,33\pm 0,01$ $K_d=3,80\pm 0,01$ nM N=630 000	$n=1,41\pm 0,01$ $K_d=3,80\pm 0,01$ nM N=1 070 000	$n=1,26\pm 0,01$ $K_d=3,90\pm 0,01$ nM N=560 000
erlotinib	$n=0,92\pm 0,02$ $K_d=2,00\pm 0,02$ nM N=390 000	$n=0,99\pm 0,01$ $K_d=1,80\pm 0,01$ nM N=630 000	$n=1,03\pm 0,01$ $K_d=1,70\pm 0,02$ nM N=1 000 000	$n=0,95\pm 0,01$ $K_d=1,90\pm 0,01$ nM N=500 000
lapatinib	$n=1,04\pm 0,01$ $K_d=6,30\pm 0,01$ nM N=390 000	$n=1,21\pm 0,01$ $K_d=5,10\pm 0,01$ nM N=630 000	$n=1,36\pm 0,01$ $K_d=4,90\pm 0,02$ nM N=1 010 000	$n=1,20\pm 0,01$ $K_d=4,90\pm 0,02$ nM N=520 000

5. táblázat: Kináz inhibitorral kezelt F1-4 sejtek EGFR expressziótól függő EGF kötése a Hill-modell alapján

A kontroll és inhibitorral kezelt sejtek látszólagos disszociációs konstansai (K_d), valamint a Hill-együtthatók (n), illetve az ezekhez tartozó SD értékek szerepelnek a táblázatban. A teljes sejtpopuláció EGFR expressziójának meghatározása Qifikit kalibrációval történt. Az alacsony, közepes és magas intenzitású alpopulációk EGFR expressziójának meghatározásához azt tételeztük fel, hogy a Hill-moddellel történő illesztés során kapott legmagasabb fluoreszcens EGF intenzitás arányos a receptor expressziószintjével. N jelöli a sejtenkénti receptorszámot.

Megállapítható, hogy a kináz domén konformációjának és az EGFR expressziójának jelentős szerepe van a látszólagos kooperativitás és affinitás alakulásában. Mind a három, fent bemutatott kondíció esetén az expressziószint emelkedésével a látszólagos kooperativitás egyre pozitívabbá válik. Az is látható, hogy amennyiben erlotinibbel a kinázt az aktív konformációban stabilizáljuk, a látszólagos kooperativitás kissé csökken a kontroll sejtek ligandkötéséhez képest, azonban a kötődési

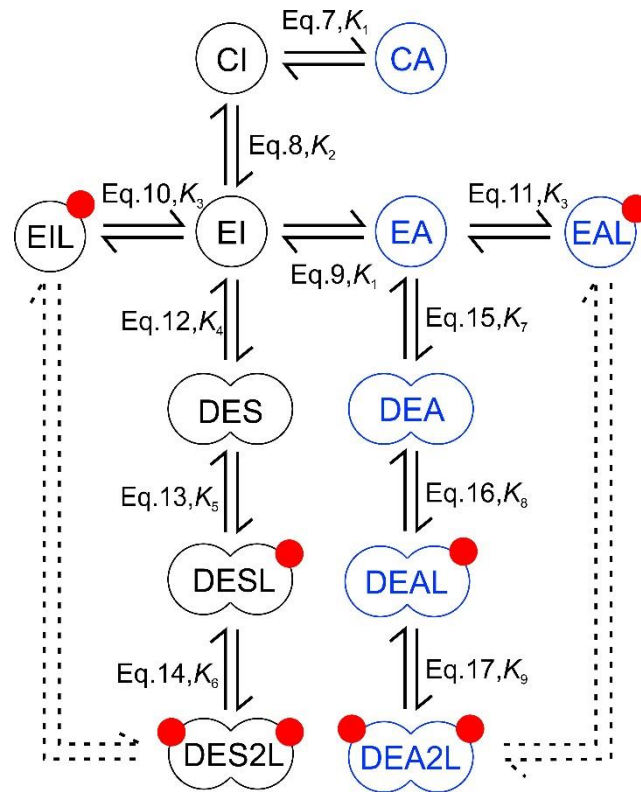
affinitás magasabbnak adódik. Ezzel szemben ha a kináz inaktív konformációt vesz fel, melyet a lapatinib kezeléssel sikerült elérnünk, akkor a látszólagos kooperativitás a kontrollhoz képest nem változik jelentősen, azonban az affinitás igen: a magasabb K_d értékek csökkent kötődési erősségre utalnak.

5.5. Az EGFR ligandkötésének új, molekuláris modellje

A kináz inhibitorokkal történő kezelések következtében arra az eredményre jutottunk, hogy a kináz lehetséges konformációi jelentősen befolyásolják a receptor ligandkötésének jellemzőit. Ismert az is, hogy a kináz domének is képesek asszociációk létrehozására [46]. Annak céljából, hogy az intra- valamint az extracelluláris domén konformációi közötti kapcsolatot feltárhassuk, és molekuláris szinten jellemezhessük, létrehoztunk egy új modellt, mely az alábbi körülmények fennállását tételezi fel:

- Az extracelluláris domén nyitott és zárt konformációi egymással egyensúlyban állnak. Habár a ligand nélküli ECD-nek egyéb konformációi is lehetségesek [85], azokat a modell nem veszi figyelembe, a független változók minimalizálása érdekében.
- A receptor dimerizációja csak nyitott konformációjú ECD esetén lehetséges [86], [87].
- A kináz domén két lehetséges konformációja az aktív és az inaktív típus. Megjegyezzük, hogy bár az irodalomban ezektől különböző konformációkkal is találkozhatunk [88], a modellben, a létrejövő molekulatípusok minimalizálása érdekében az előbbi kettőre kellett szorítkoznunk.
- Két, nyitott konformációban lévő ECD asszociációja esetén a kináz domén szimmetrikus és aszimmetrikus dimereket is képezhet, ahogy arra elektronmikroszkópos eredmények is utalnak [89]. Szimmetrikus KD dimerekben a kináz inaktív konformációban van, míg aktív kinázok figyelhetők meg az aszimmetrikus dimerekben. Árnyalja a képet, hogy irodalmi adatok alapján ezektől eltérő konformációjú kináz dimerek is kialakulhatnak, köztük olyan is, ahol két, katalitikusan aktív kináz aszimmetrikus dimert hoz létre [90].
- A szimmetrikus és aszimmetrikus KD dimerekből felépülő receptor dimerek eltérő affinitással kötik az EGF-et.
- A monomer receptorban a kináz aktív és inaktív konformációt egyaránt felvehet.
- A ligand csak az ECD nyitott konformációjához képes kötődni. A korábbiakban közölt modellek között megtalálható olyan, ahol figyelembe vették a zárt ECD

esetleges ligandkötését [51], míg olyan is, amely ezt nem tette meg [91]. Mivel eredményeink arra utalnak, hogy a szimmetrikus kináz dimerekkel rendelkező receptor dimerek alacsony affinitással képesek megkötni az első ligandumot, egy ezen felüli alacsony affinitású kötőhely bevezetése megbízhatatlanná tette volna a modellt. Ezért számításaink során feltettük, hogy az EGF csak az ECD nyitott konformációjához kötődik.



18. ábra: Az extracelluláris és a kináz domén konformációváltozásait figyelembe vevő molekuláris modell.

Az ECD nyitott (E) és zárt (C) konformációban fordul elő, ezekhez egyaránt tartozhat aktív (A) vagy inaktív (I) konformációjú kináz domén, azaz összesen 4 típusú monomer jöhet létre (CI-CA: az ECD zárt konformációban van, a KD inaktív vagy aktív; EI-EA: az ECD nyitott konformációban van, a KD inaktív vagy aktív). A nyitott ECD-vel rendelkező receptorok képesek az EGF megkötésére (piros körök), a ligandkötött receptorokat L betűvel jelöljük a nevük végén. A nyitott ECD-vel rendelkező receptorok dimerizációra is képesek, ezeket D betűvel jelöljük a nevük elején.

Az ábrán késsel láthatóak azon monomerek és dimerek, melyekben a kináz aktív konformációban van, míg feketével azok, amelyek inaktív kináz doménnel rendelkeznek. Három különböző receptor dimer fordul elő, melyekben a kináz domének szimmetrikus (S), vagyis inaktív dimert képeznek: DES, DESL, DES2L- 0, 1 és 2 molekula megkötött EGF. Ugyanez az elnevezési mód érvényes az aktív konformációjú, aszimmetrikus (A) KD dimerek esetén is (DEA, DEAL, DEA2L).

A folytonos vonallal jelölt nyilak mutatják azokat az átrendeződéseket, melyeket az egyensúly beállása szempontjából a modell közvetlenül figyelembe vesz, mellettük fel van tüntetve a vonatkozó egyenlet és konstans. Bár a szaggatott nyilakkal jelölt átrendeződések (a ligandkötött monomerek dimerizációja) közvetlenül nem

szerepelnek a modellben, a rendszert jellemző linkage meghatározása szempontjából szükségesek, és a Hess-tétel értelmében ezen útvonalak nem befolyásolják az egyensúlyi állapotot.

A 18. ábrán bemutatott modell 12 molekulatípust foglal magába, melyek egyensúlyi állapotát 11 egyenlet és 9 konstans írja le. Az alábbi öt egyenlet a monomerek konformációváltozását és ligandkötését írja le:

$$[CI] = K_1 [CA] \quad (7)$$

$$[CI] = K_2 [EI] \quad (8)$$

$$[EI] = K_1 [EA] \quad (9)$$

$$[EI][EGF] = K_3 [EIL] \quad (10)$$

$$[EA][EGF] = K_3 [EAL] \quad (11)$$

ahol K_1 és K_2 a kináz és az extracelluláris domén konformációváltozásait leíró egyensúlyi állandó, K_3 pedig a nyitott konformációjú ECD-hez kötődő EGF disszociációs konstansa.

Az alábbi egyenletek az inaktív KD-vel rendelkező monomerek dimerizációját írják le, amely következtében szimmetrikus kináz dimerek jönnek létre:

$$[EI][EI] = K_4 [DES] \quad (12)$$

$$[DES][EGF] = K_5 [DESL] \quad (13)$$

$$[DESL][EGF] = K_6 [DES2L] \quad (14)$$

ahol K_4 a ligandot nem kötött, szimmetrikus KD dimerrel rendelkező dimer disszociációs konstansa, K_5 és K_6 pedig az elsőként és másodikként kötődő EGF molekula disszociációs konstansai.

Az aktív kinázzal rendelkező monomerek dimerizációját, valamint a létrejött aszimmetrikus KD dimerrel rendelkező dimer ligandkötését az alábbi egyenletek írják le:

$$[EA][EA] = K_7 [DEA] \quad (15)$$

$$[DEA][EGF] = K_8 [DEAL] \quad (16)$$

$$[DEAL][EGF] = K_9 [DEA2L] \quad (17)$$

ahol K_7 a ligandot nem kötött, aszimmetrikus KD dimerrel rendelkező dimer disszociációs konstansa, K_8 és K_9 pedig az elsőként és másodikként kötődő EGF molekula disszociációs konstansai.

Az egyes sejtekhez kötődő EGF mennyiségét ($[EGF_{bound}]$) és a sejtenkénti receptorszámot ($[R_{tot}]$) az alábbi két összefüggés adja meg:

$$[EGF_{bound}] = [EIL] + [EAL] + [DESL] + [DEAL] + 2([DES2L] + [DEA2L]) \quad (18)$$

$$[R_{tot}] = [CI] + [CA] + [EI] + [EA] + [EIL] + [EAL] + 2([DES] + [DESL] + [DES2L] + [DEA] + [DEAL] + [DEA2L]) \quad (19)$$

Az EGF-re vonatkozó disszociációs állandók mértékegysége nM, a receptor disszociációs állandói receptorszám/sejt mértékegységben értendők. Az előzőekben tárgyalt 7-19 egyenletek egy másodfokú egyenletrendszerként írhatók fel, aminek az ismeretlenjei a 12 szerepeltetett molekulatípus és a sejtekhez kötődött EGF koncentráció. Az egyenletrendszer Mathematica szoftverrel került megoldásra (Wolfram Research, Champaign, IL). A mind a 13 ismeretlenre pozitív eredményt adó megoldást tekintettük elfogadottnak.

Mivel a kontroll, az erlotinibbel és a lapatinibbel kezelt sejtpopulációkat EGFR expressziójuk szerint három részre osztottuk (vagyis a három alpopulációval, plusz a teljes sejtpopulációval dolgoztunk, lásd 4.5. fejezet), összesen 12 kísérleti körülmény került illesztésre a modellel. Az illesztett egyenletek és a kísérleti adatok közötti hiba négyzetét egy globális algoritmus segítségével minimalizáltuk:

- Mind a 12 körülmény párhuzamosan került illesztésre a K_2 - K_9 paraméterekkel, míg a K_1 - amely az aktív és inaktív KD-k közti egyensúlyt írja le - három különböző értéket vehetett fel, a három kezelési körülménynek megfelelően. Így a 12 adatsorból származó 156 adatpontra globálisan történt meg a 11 független paraméter illesztése.
- Matlab szoftverben, a globális keresőalgoritmust (Global Search Algorithm) használva sikerült megtalálni a globális minimumokat. Az illesztett paraméterek konfidencia intervallumainak meghatározásához az optimalizációs lépést százszor hajtottuk végre, melynek eredménye a Függelék fejezetben látható.

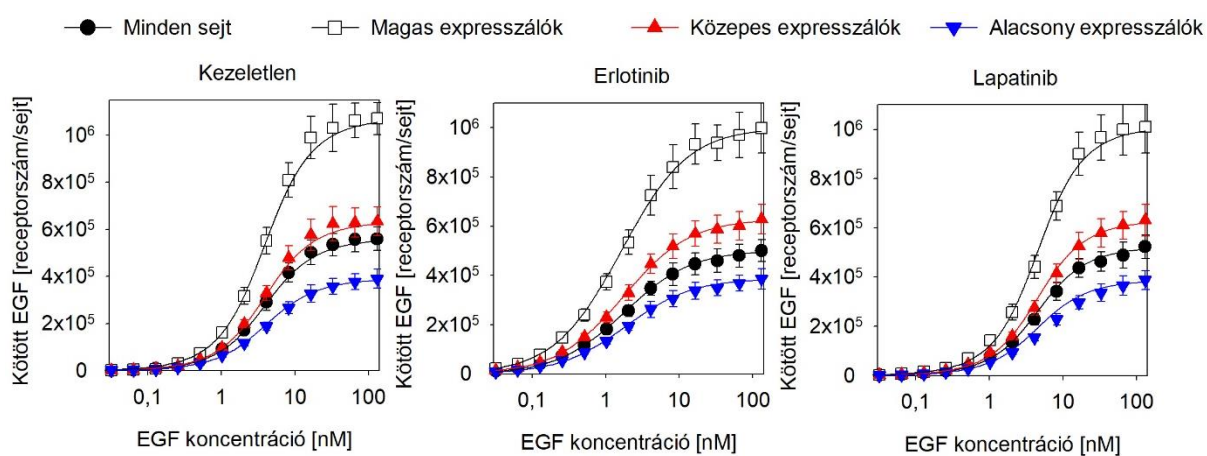
5.5.1. A kísérleti adatok megillesztése az új modellel

Az új modell sikeresnek bizonyult a korábbi, kvantitatív EGF kötődési vizsgálatok során kapott eredményeink megillesztése terén (19. ábra). Az illesztés eredményeiből az látszik, hogy a kináz domén inaktív konformációja a kedvezőbb minden olyan kísérleti

körülmény során, ahol nem kerül EGF a rendszerhez (6. táblázat). Ezt az egyensúlyt tolják el az inhibitorok azzal, hogy a várt hatásuknak megfelelően a kináz aktív vagy inaktív konformációját stabilizálják. Az is megállapítható, hogy ligandum hiányában az ECD preferenciálisan zárt konformációban van, valamint az inaktív kinázzal bíró monomerek sokkal kevésbé hajlamosak a dimerizációra, mint az aktív kinázzal rendelkező társaik.

A létrejött dimerek ligandkötési kooperativitására és affinitására a KD konformációja jelentős befolyással van. Míg aszimmetrikus KD dimerek esetén az első ligandum kötődése tized nM-os K_d -vel jellemezhető, azaz magas affinitással kötődik, addig a második ligandum kötődése sokkal alacsonyabb affinitással megy végbe, ami igen jelentős negatív kooperativitásra utal. Szimmetrikus KD dimerek fennállása esetén pozitív kooperativitást állapíthatunk meg, mivel az első ligandum megkötése nagyon alacsony affinitással történik, de a második ligandum kötődése tized nM-os K_d -vel írható le.

Mindezekből az a következtetés vonható le, hogy a kináz domén és a ligandkötődés között szoros kapcsolat áll fenn, vagyis az előbbi figyelembevétele elengedhetetlen az EGF kötődéses eredmények elemzésekor.



19. ábra: Az egyensúlyi EGF kötődés adatsorainak megillesztése az új modellel

A 17. ábrán bemutatott kísérleti adatok kerültek megillesztésre az új, molekuláris modellel. Az illesztett modell-paraméterek a 6. táblázatban láthatók.

Paraméter	Jellemző	A paraméter kiterjedése	Érték (95% CI)
K_1	Az inaktív és aktív KD egyensúlyi állandója (>1 esetén az inaktív konformáció a preferált)	kezeletlen	104 (67-155)
		erlotinib (aktív KD)	25 (17-38)
		lapatinib (inaktív KD)	162 (101-243)
K_2	Az ECD zárt és nyitott konformációjának egyensúlyi állandója (>1 esetén a zárt konformáció a preferált)	globális	2,9 (1,6-4,4)

K_3	Nyitott ECD-vel rendelkező monomer EGF kötésének K_d -je	globális	1,3 nM (0,8-1,8 nM)
K_4	Inaktív KD-vel rendelkező monomerek dimerizációja	globális	36 900 (15 600-68 700)
K_5	Az első EGF kötődésének K_d -je egy dimerhez, ami inaktív, szimmetrikus kináz dimerrel rendelkezik	globális	95 nM (69-99 nM)
K_6	A második EGF kötődésének K_d -je egy dimerhez, ami inaktív, szimmetrikus kináz dimerrel rendelkezik	globális	0,45 nM (0,34-0,53 nM)
K_7	Aktív KD-vel rendelkező monomerek dimerizációja	globális	480 (86-2 400)
K_8	Az első EGF kötődésének K_d -je egy dimerhez, ami aktív, aszimmetrikus kináz dimerrel rendelkezik	globális	0,1 nM (0,02-0,16 nM)
K_9	A második EGF kötődésének K_d -je egy dimerhez, ami aktív, aszimmetrikus kináz dimerrel rendelkezik	globális	2,96 nM (2,93-2,97 nM)

6. táblázat: A modell-paraméterek alakulása a 12 kísérleti körülmény megillesztése során

Mind a 12 görbe globálisan került illesztésre a K_2 - K_9 paraméterekkel, míg a K_1 három különböző értéket vehetett fel, a három kezelési körülménynek megfelelően (kezeletlen/erlotinib/lapatinib). A konfidencia intervallumokat az illesztés 100-szor történő elvégzésével határoztuk meg. A konformációs egyensúlyi folyamatokat jellemző együtthatók (K_1 , K_2), koncentráció-hányadosokat fejeznek ki, ezért azoknak nincs mértékegységük. A dimerizációs folyamatokat leíró konstansok (K_4 , K_7) mértékegysége receptorszám/sejt.

5.5.2. Az EGFR típusainak előfordulása a modell alapján

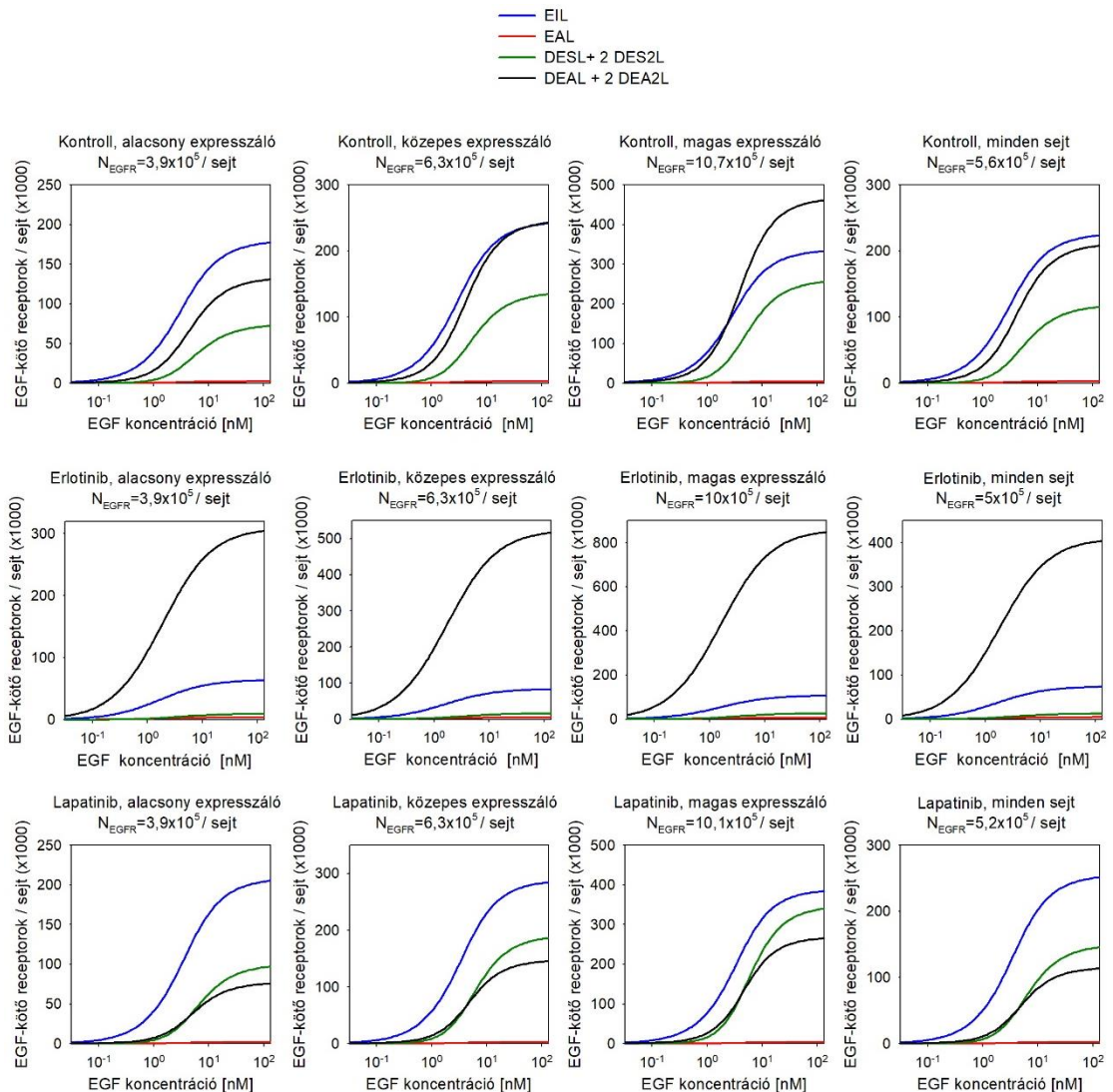
Az illesztett paramétereket az egyenletekbe behelyettesítve nemcsak a sejtekhez kötődött EGF mennyiségét határozhatjuk meg (20. ábra), hanem az egyes receptorfajták előfordulásának expresszió- és koncentrációfüggését is (21. ábra). A modellszámítások szerint mindössze három molekulatípus köti az EGF-et kimutatható mértékben a vizsgált kísérleti körülmények között: az inaktív KD-ű monomer, valamint a szimmetrikus vagy aszimmetrikus KD dimerrel rendelkező dimerek.

A receptorspecieszek ligandkötésének mennyiségi meghatározása alapján (20. ábra) az EGF számottevő mértékben kötődik a monomer, inaktív kinázzal bíró receptorokhoz (EIL), ám nem ez a helyzet aktív kináz esetén (EAL), mivel azon monomerek a ligandkötés után azonnal dimerizálódnak, így a modell szerint nem vesznek részt a ligandkötésben. A monomerekhez kötődő EGF mennyiségének az aránya a receptor expresszió emelkedése esetén csökken, ami hozzájárulhat az -általunk is kimutatott- pozitív látszólagos kooperativitás növekedéséhez.

A dimerek közül mind a szimmetrikus, mind az aszimmetrikus KD dimereket alkotók részt vesznek az EGF kötésben, az utóbbi hozzájárulása az EGFR expressziójának növelésével emelkedik.

Az erlotinib- mivel az aktív KD konformációt stabilizálja- szinte teljesen meggátolja az inaktív, vagyis szimmetrikus KD dimerekkel rendelkező receptor dimerek ligandkötését, ahogy a monomereket is (20. ábra, középső panel). Vagyis erlotinib jelenlétében az EGF csaknem kizárólag az aszimmetrikus KD dimereket alkotó receptor dimerekhez kötődik.

Ezek mellett, a modell alapján az is elmondható, hogy a lapatinib sejtekhez adása következtében a monomer, inaktív KD-ű receptor a meghatározó az EGF kötésben, bármely expressziós szint esetén. Várt hatásának megfelelően az aktív KD dimerekkel rendelkező receptor dimerek ligandkötését jelentősen csökkenti (20. ábra, alsó panel).

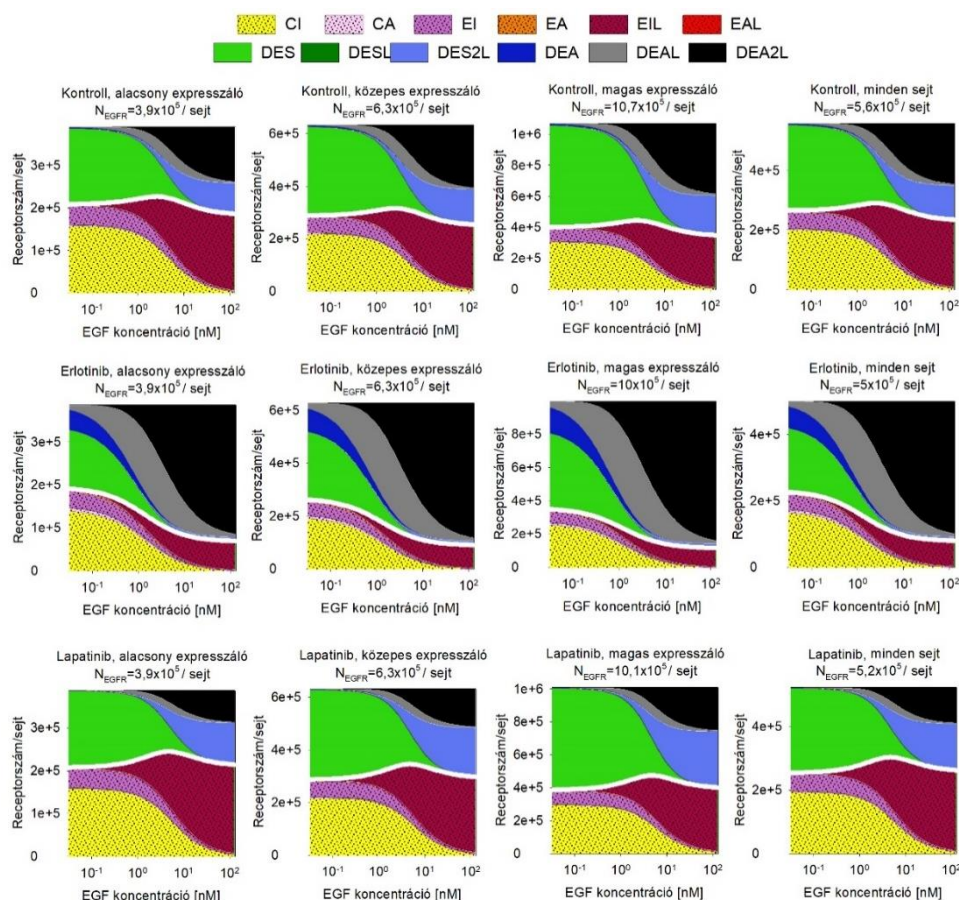


20. ábra: Az EGF kötődése a különböző monomer és dimer receptortípusokhoz

Az egyensúlyi EGF kötődés a 6. táblázatban bemutatott paraméterek alapján került kiszámításra a három kezelési körülmény (kontroll, erlotinib, lapatinib), valamint

a különböző receptor expressziós szintek (alacsony-közepes-magas és teljes sejtpopuláció) esetén külön-külön. Az ábrán a kötődő EGF molekulák száma látható a monomer (EIL, EAL) és a dimer receptorokhoz (DESL + 2DES2L; DEAL + 2DEA2L). Mivel a két molekula EGF-et kötött dimerek számát megszoroztuk kettővel, a görbék a kötött EGF mennyiségét mutatják.

A három kezelési kondíció tehát megváltoztatja a sejteken előforduló receptorspeciezek ligandkötését, ahogy egymáshoz viszonyított arányát is. Ezt szemlélteti a 21. ábra. A hozzáadott ligandum koncentrációjának függvényében elsősorban az erlotinib kezelés esetén nő meg a dimerek száma (21. ábra, középső panel), azaz több, a jelátvitelben résztvevő aszimmetrikus KD dimer keletkezik, mint a kontroll (21. ábra, felső panel) és a lapatinib kezelés hatására (21. ábra, alsó panel). Utóbbi kettőnél szembejön, hogy az EGF jelenléte nem befolyásolja jelentős mértékben a monomerek és dimerek arányát, ahogy az is, hogy viszonylag sok, ligandumtól független, előre összeszerelődött dimert láthatunk. A szimmetrikus KD dimerekből felépülő dimerek (a 21. ábrán világoszölddel jelölve) mennyisége a ligandkoncentrációtól szinte független és csak magasabb EGF koncentráció (kb. 5 nM és e felett) jelenlétében kezd el számottevően csökkenni.



21. ábra: A monomer és dimer receptorok mennyiségének EGF koncentrációtól és receptor expressziótól való függése

Az ábrán a sejtenként előforduló receptorspecieszek mennyiségét tüntettük fel az EGF koncentráció függvényében, a különböző expressziós szintű alpopulációkra vonatkozólag. A vastag fehér vonal választja el a monomereket és a dimereket egymástól.

A rövidítések jelentése: **CI**: monomer, melyben az ECD zárt és a KD inaktív; **CA**: monomer, melyben az ECD zárt és a KD aktív; **EI**: monomer, melyben az ECD nyitott és a KD inaktív; **EA**: monomer, melyben az ECD nyitott és a KD aktív; **EIL**: egyszeresen ligandkötött monomer, melyben az ECD nyitott és a KD inaktív; **EAL**: egyszeresen ligandkötött monomer, melyben az ECD nyitott és a KD aktív; **DES**: dimer, melyben az ECD nyitott és a KD szimmetrikus dimert alkot; **DESL**: egyszeresen ligandkötött dimer, melyben az ECD nyitott és a KD szimmetrikus dimert alkot; **DES2L**: kétszeresen ligandkötött dimer, melyben az ECD nyitott és a KD szimmetrikus dimert alkot; **DEA**: dimer, melyben az ECD nyitott és a KD aszimmetrikus dimert alkot; **DEAL**: egyszeresen ligandkötött dimer, melyben az ECD nyitott és a KD aszimmetrikus dimert alkot; **DEA2L**: kétszeresen ligandkötött dimer, melyben az ECD nyitott és a KD aszimmetrikus dimert alkot.

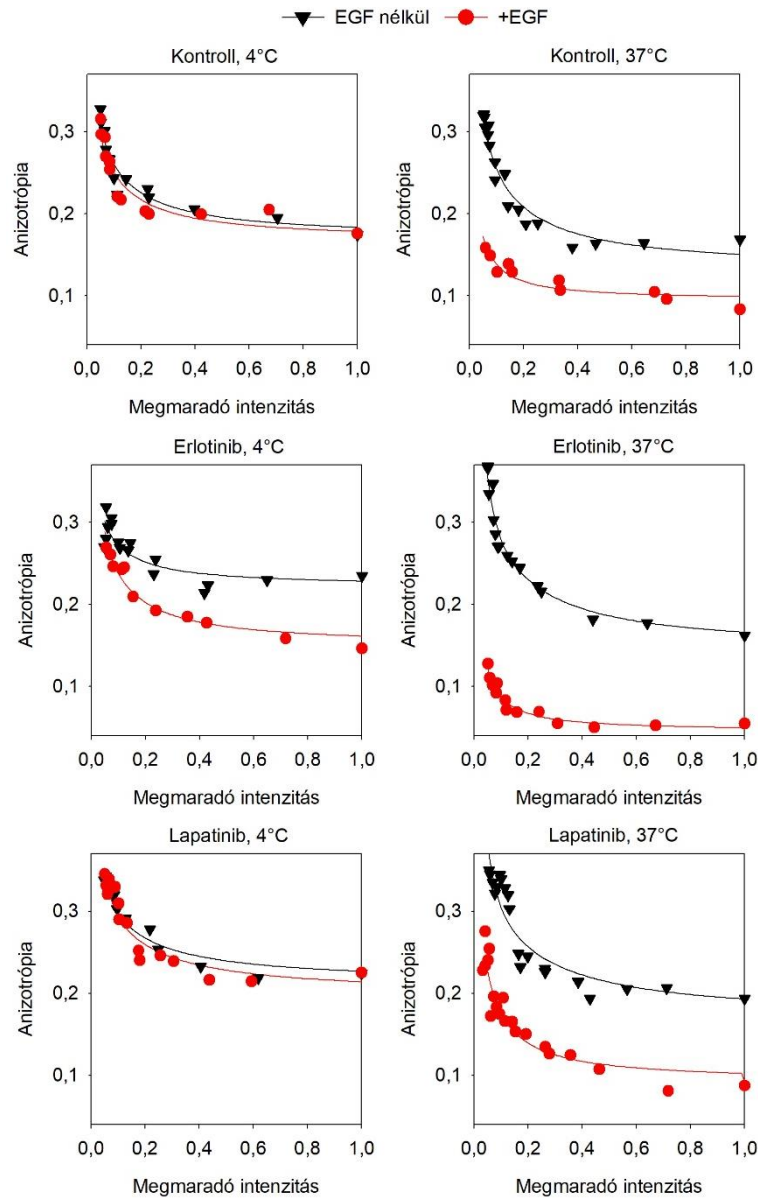
A ligandum általi dimerizációs és aktivációs mechanizmusnak - mely az EGFR kapcsán a legszélesebb körben elfogadott elmélet a receptor funkciójának tekintetében - látszólag ellentmondanak a modell jóslatai, legalábbis a kontroll sejtek esetében, ahol nagyobb dimerizációs hajlamot várnánk. Ennek hiányát annak tulajdonítjuk, hogy a sejtek EGF kezelése jégen történt meg kísérleteinkben, az internalizáció visszaszorítása végett.

A jelenség tisztázására, vagyis a modell jóslatának alátámasztására és a ligandum hőmérséklettől függő hatásának kimutatására homo-FRET méréseket végeztünk, mellyel lehetőség van az EGFR klaszterizációjának vizsgálatára. Ezzel az 5.5.3. alfejezet foglalkozik.

5.5.3. A ligand hatására végbemenő klaszterizációs változások igazolása homo-FRET-tel

A homo-FRET módszer lényege, hogy ugyanolyan típusú fluorofór a donor és az akceptor, melyek között az energiáttranszfer létrejön. A homo-FRET kölcsönhatás egyetlen mérhető paramétere a fluoreszcencia anizotrópia megváltozása. Egy fluoreszcens molekula anizotrópiáját az határozza meg, hogy polarizált fényel történő gerjesztés után mennyire maradnak rendezettek az emissziós dipólusai. Egy molekulaklaszterben a polarizált fény által gerjesztett fluorofór homo-FRET által olyan fluorofórokat gerjeszt, melyek emissziós dipólusai nem párhuzamosak a donor molekuláéval, vagyis a kibocsátott fotonok rendezettsége, anizotrópiája csökken. Esetünkben a fluorofór a kifejeződő EGFR-hez konjugált GFP volt, amit 405 nm-es lézerrel lépésenként fotoelhalványítottunk, így folytonosan csökkenő fluorofór denzitásokat hoztunk létre. Ha csökken a fluorofórok denzitása, csökken a homo-FRET valószínűsége, ezáltal nő a klaszter fluoreszcencia anizotrópiája. A 22. ábrán kerül

bemutatásra a minták anizotrópia értékeinek alakulása a megmaradó fluoreszcencia függvényében.



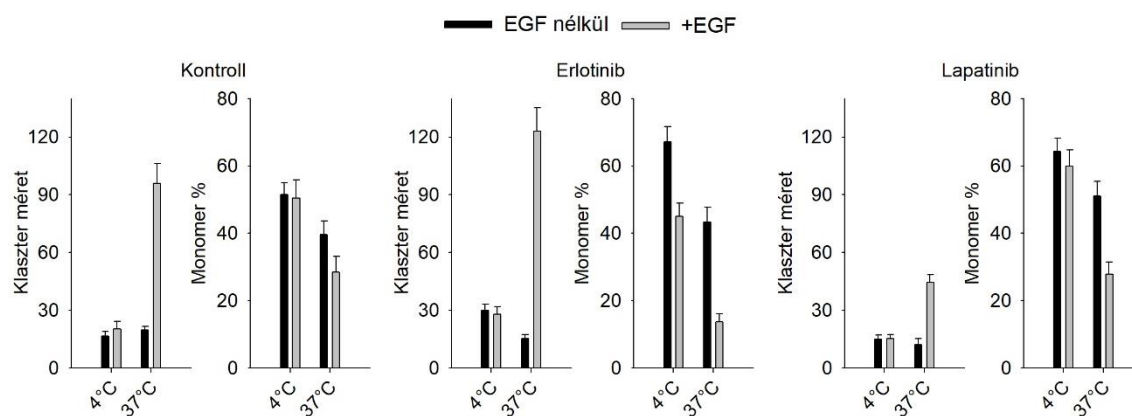
22. ábra: Kontroll és kináz inhibitorokkal előkezelt F1-4 sejtek EGF stimuláció hatására végbemenő klaszterizációs változásai

A kináz inhibitorokkal előkezelt sejteket jégen vagy 37°C-on stimuláltuk az EGF-fel 15 percig, majd a kezelési hőmérséklet megtartása mellett a mintákat Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott sejtvonallal GFP-vel konjugált EGFR-t fejez ki, így annak lépésenkénti fotoelhalványításával különböző fluorofór denzitásokat hoztunk létre. Az emissziót két csatornában detektáltuk: az egyikben a gerjesztő fényvel párhuzamos, a másikban az arra merőleges polarizációjú fényt. A mintákról készült képsorozatokon azonosítottuk a sejtek membránjait a vízfeltöltéses algoritmust használva, Matlab szoftver segítségével. A membránmaszkokban kiszámított anizotrópia értékeket a megmaradó fluoreszcencia függvényében ábrázoltuk a fenti, reprezentatív ábrán.

Látható, hogy 4°C-on az EGF stimuláció csak az erlotinibbel kezelt sejteken okozott anizotrópia csökkenést (22. ábra, középső panel), vagyis váltotta ki a receptor klaszterizációját. Ezzel szemben a kontroll (22. ábra, felső panel) és a lapatinibbel kezelt minták (22. ábra, alsó panel) nem mutatnak változást az anizotrópiában az EGF-fel nem stimulált sejtekhez képest. Ezek a megfigyelések egybeesnek a 21. ábrán bemutatott, a molekuláris modell által jósolt monomer-dimer megoszlással.

37°C-on azonban mind a három kezelési kondíció mellett megfigyelhető az EGF stimuláció által kiváltott klaszterizáció, amelyre az alacsonyabb anizotrópia értékek engednek következtetni. Az erlotinibbel kezelt minta esetén figyelhető meg ez a legkifejezettebben.

Egy, a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett módszer segítségével arra is lehetőség van, hogy meghatározzuk az anizotrópiák alapján a kialakuló receptor-klaszterek nagyságát, valamint a monomerek arányát [92]. Mivel az 5.5 fejezetben bemutatott modell csak a monomer és dimer struktúrákat különbözteti meg egymástól és a nagyobb méretű klaszterek létrejöttét nem veszi figyelembe, a homo-FRET révén kapott klaszterek mérete és a modell által jósolt dimerek mennyisége közvetlenül nem összehasonlítható. Jól kimutatható viszont a kettő korrelációja, ahogy az a 23. ábrán is látható. Ez a modell értelmezhetőségének és hasznosságának egy további alátámasztása.



23. ábra: Az EGFR homoklaszterizációja kontroll és EGF stimulált F1-4 sejteken

A kontroll és kináz inhibitorral kezelt F1-4 sejteket EGF-fel stimuláltuk 4°C vagy 37°C-os hőmérsékleten. A konfokális mikroszkópos mérés során a sejtek által expresszált ErbB1-GFP intenzitását lépésenként fotoelhalványítottuk, az emissziót pedig két csatornában detektáltuk: az egyikben a gerjesztő fényvel párhuzamos, a másikban az arra merőleges polarizációjú komponens. A mintákról készült képsorozatokon azonosítottuk a sejtek membránjait a vízfeltöltéses algoritmust használva, Matlab szoftver segítségével. A membránmaszkokban kiszámított anizotrópia és megmaradó intenzitás értékekre egy olyan egyenletet illesztettünk, amely leírja az anizotrópiaváltozás és a receptor-klaszterek mérete, valamint a monomerek

aránya közötti összefüggést. A feltüntetett hibák a négy képsorozatból számított SEM értékeket jelölik.

5.6. Az elisidepsin oxigénszinttől függő kötődése a sejtekhez

A tumorelleses gyógyszerekről általánosságban elmondható, hogy a daganatok centrális részein kialakuló oxigénhiányos környezetben hatásukat kevésbé tudják kifejteni.

Számos, a munkacsoport által gyakran használt sejtvonal elisidepsinre vonatkozó félhatásos gátló koncentrációja (IC₅₀) meghatározásra került kollégáim által, a kutatásba való becsatlakozásomat megelőzően. Az eredmények a 7. táblázatban láthatók.

Sejtvonalak	IC ₅₀ (µM)	
	normoxia	4-napos hypoxia
A431	7,8 ± 0,8	15,4 ± 1,8
CHO	15,0 ± 0,8	66,0 ± 9,3
HaCaT	7,5 ± 0,9	27,6 ± 4,2
HeLa	9,1 ± 1,2	16,5 ± 1,7
MCF-7	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,5
MDA-MB-453	3,6 ± 0,5	3,9 ± 0,7
SKBR-3	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,5

7. táblázat: Az elisidepsin sejtvonalakra vonatkozó félhatásos gátló koncentrációi normoxiában és 4 napos hypoxiában történő tenyésztés esetén

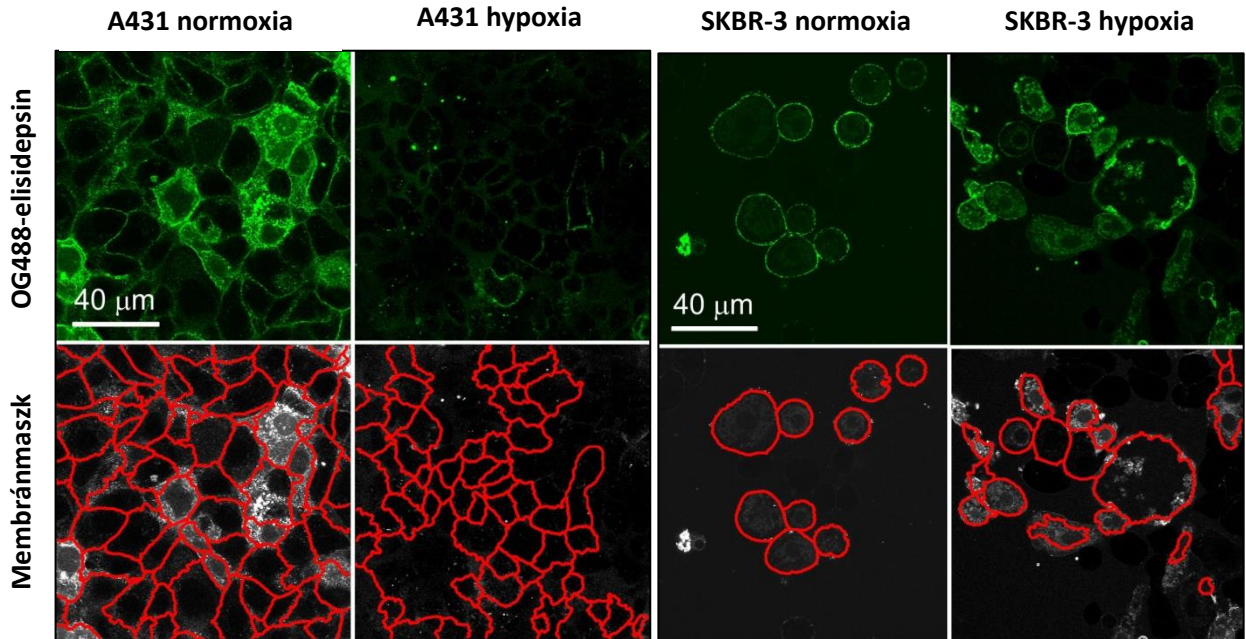
A sejteket 96 lyukú plate-en tenyésztették munkatársaim 1% oxigént tartalmazó gázkörnyezetben 4 napig, 37°C-on. A normoxiás minták esetén a sejteket egy nappal a gyógyszer hozzáadása előtt tették 96 lyukú plate-re. Az elisidepsinből készült hígítási sorozattal 30 percig kezelték a sejteket, ami után további 3 napig tenyésztették őket normoxiás vagy hypoxiás gázkörnyezetben. A sejtek életképességét WST-1 reagens segítségével határozták meg. A mérési pontokat ezt követően a Hill-egyenlettel illesztették, ami alkalmas a dózis-hatás görbék illesztésére és a félhatásos gátló koncentráció értékek számszerű megadására. A táblázatban az átlagos IC₅₀ értékek szerepelnek, melyek három, egymástól független mérésből kerültek meghatározásra, mellettük a vonatkozó középérték közepes hibája (SEM) látható.

A félhatásos gátló koncentrációk alapján elmondható, hogy a sejtvonalakat két típusba sorolhatjuk: az egyikbe az elisidepsinre kevésbé szenzitív sejteket (A431, CHO, HaCaT, HeLa), melyeknél magasabb gyógyszer koncentráció szükséges ahhoz, hogy a sejtek fele elpusztuljon. Ezen sejtvonalak érzékenysége az oxigénmegvonás következtében jellemzően tovább csökken.

A vizsgált sejtvonalak másik csoportja (MCF-7, MDA-MB-543, SKBR-3) sokkal szenzitívebb az elisidepsinnel szemben, és ez az érzékenység hypoxiás tenyésztés esetén sem csökken.

A következő részben konfokális mikroszkópos (24. ábra) és áramlási citometriás (25. ábra) módszerekkel vizsgáltuk a gyógyszer sejtmembránhoz kötődését. Az előbbi

esetben két sejtvonalat választottunk a kísérleteinkhez: az A431-et, mivel a kapott IC_{50} értékek értelmében várható, hogy a hypoxia csökkenti az elisidepsin kötődését, valamint kontrollként az SKBR-3 sejtvonalat, ugyanis itt az oxigénmegvonás várhatóan nem okoz változást a kötődésben a normoxiás tenyésztéshez képest.



24. ábra: Az elisidepsin kötődésének vizsgálata konfokális mikroszkóppal A431 és SKBR-3 sejtvonalakon

A normoxiában és 4 napon át hypoxiában tenyésztett sejteket megjelöltük az elisidepsin OregonGreen488 festékkel konjugált és jelöletlen változatának 1:4 arányú elegyével jégen. Az A431 sejteket $2\mu\text{M}$, az SKBR-3 sejteket $0,5\mu\text{M}$ végkoncentrációban kezeltük az elisidepsinnel, ezek az értékek hozzávetőlegesen négyszer alacsonyabbak, mint a normoxiában meghatározott félhatásos gátló koncentrációk. Két perc elteltével a mintákat mostuk, majd Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal ($60\times$, $NA=1,35$) képeket vettünk fel a sejtekről. A fluorofórt 488 nm-en gerjesztettük és emisszióját a 493-598 nm hullámhossztartományban detektáltuk. A membránmaszkot a vízfeltöltéses algoritmus segítségével készítettük el Matlab szoftverben futtatva, a sejtek kézi kijelölésével.

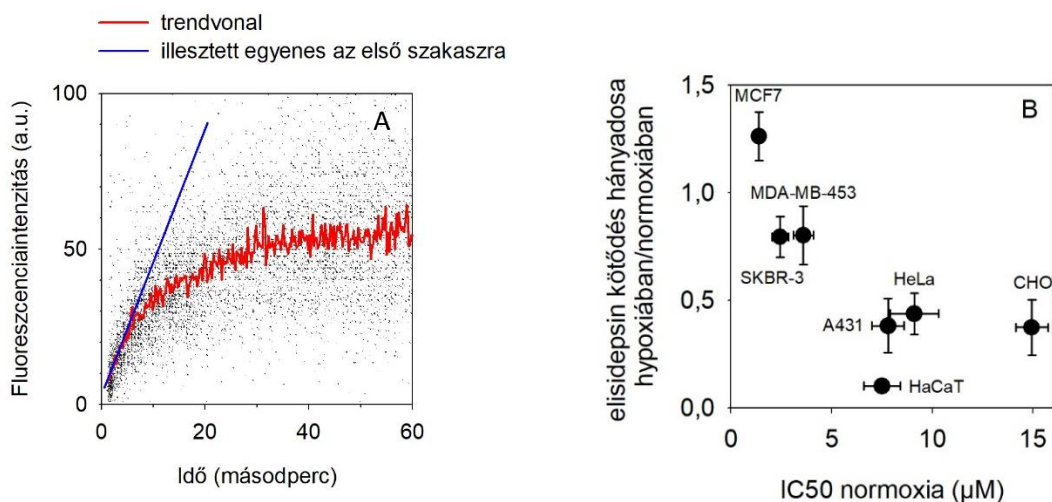
Megállapítjuk, hogy a konfokális mikroszkópos megfigyeléseink során a félhatásos gátló koncentrációk alapján feltételezett változásokat kaptuk. A normoxiában tenyésztett A431 sejtekhez a fluoreszcens elisidepsin jelentős mértékben kötődött, és a sejtekbe való bejutása is megfigyelhető. A hypoxiában tenyésztett változat esetén hasonlóan erős fluoreszcenciát nem látunk.

Az SKBR-3 sejtvonalnál megfigyeltük, hogy hypoxiában történt tenyésztés esetén is képes az elisidepsin a sejtekhez kötődni, vagyis a sejtek gyógyszerrel szembeni érzékenysége nem csökkent az oxigénmegvonás következtében.

Megfigyeléseinket áramlási citométeres vizsgálatokkal egészítettük ki. Az elisidepsin sejtekhez kötődésének kinetikáját a 7. táblázatban szereplő sejtvonalakon vizsgáltuk.

Célunk a membránhoz kötött elisidepsin intenzitásának meghatározása volt. Mivel azonban ismert, hogy a gyógyszer a kötődést követően nagyon gyorsan internalizálódik [77], az áramlási citometriával nyert intenzitások nem feleltethetők meg a membránhoz kötődött elisidepsin intenzitásának. A probléma megoldására egy olyan megközelítést dolgoztunk ki, amelyben az elisidepsin sejtekhez kötődésének kinetikáját áramlási citométerrel mértük, majd az így nyert telítési görbe kezdeti szakaszára egy egyenest illesztettünk. Kimutattuk, hogy az illesztett egyenes meredeksége egyenesen arányos a membránhoz kötődött elisidepsin intenzitásával (25/A ábra).

A fenti modellt felhasználva összehasonlítottuk a normoxiában és 5 napos hypoxiában tenyésztett sejtek elisidepsin felvételét. A gyógyszer hypoxiában tapasztalt kötődésének relatív csökkenését szemlélteti a 25/B ábra.



25. ábra: Az elisidepsin kötődésének vizsgálata áramlási citometriával

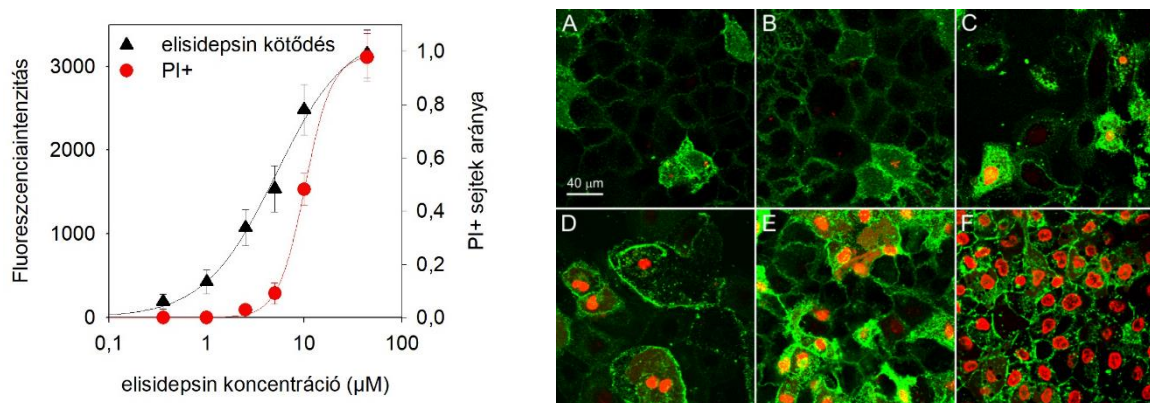
A normoxiában és az 5 napon át hypoxiában tenyésztett sejteket kezeltük az elisidepsinnel: OregonGreen488 festékkel konjugál és jelöletlen változatának 1:4 arányú elegyével, 0,5 µM végkoncentrációban. Ezt követően megkezdjük az intenzitásmérést FacsAria III áramlási citométeren. A: Az egyedi sejtek intenzitásait a fekete pontok jelölik. Ezek 0,25 másodperces időablakban számolt csúzóátlagát mutatja a piros vonal, amelynek az eltelt idő függvényében történő ábrázolásával telítési görbét kapunk. A görbe kezdeti szakaszára illesztett egyenes meredeksége a membránhoz kötődött elisidepsin mennyiségével arányos. B: Az 5 napig hypoxiában tenyésztett sejtek esetén mért fluoreszcens elisidepsin-intenzitást elosztottuk a normoxiában mért intenzitással, majd a hányadosokat a sejtvonalak normoxiás tenyésztés esetén mért IC₅₀ értékeinek függvényében ábrázoltuk. A kísérletet háromszor, egymástól függetlenül hajtottuk végre, az ábrán a fekete körök a hányadosok átlagait jelölik, mellettük a középérték közepes hibái vannak feltüntetve.

Az eredmények arra utalnak, hogy az oxigénmegvonás jelentős mértékben lecsökkenti az elisidepsin kötődését azoknál a sejtvonalaknál, ahol a félhatásos gátló koncentráció értékek a hypoxia következtében megemelkedtek (A431, CHO, HaCaT, HeLa). Megállapíthatjuk, hogy a hypoxia-okozta csökkent érzékenység a gyógyszerrel szemben a sejtekhez történő gyengébb kötődés következménye.

5.7. Az elisidepsin sejtekhez kötődésének koncentrációfüggése

Tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens elisidepsin olyan koncentrációban adva is kötődik a sejtmembránhoz, ami még nem váltja ki a sejtpusztulást. Kimutattuk, hogy a gyógyszer fluorofórral konjugált és jelöletlen változatára kapott IC_{50} értékek közel azonosak (A431 sejtvonalon a jelöletlen elisidepsin IC_{50} értéke: $8,8 \pm 1,6 \mu M$; a fluoreszcens változat esetén $9,2 \pm 1,8 \mu M$; $p > 0,1$).

A fentiekből következőleg vizsgálni kívántuk a fluoreszcens elisidepsin sejtpusztításának és sejtekhez kötődésének koncentrációfüggését konfokális mikroszkóppal (26. ábra). A sejtpusztulást propidium-jodid (PI) hozzáadásával, majd a festődött sejtek arányának kiszámításával tudtuk vizsgálni. Az így kapott ölési és kötődési adatsort külön-külön illesztettük meg a Hill-egyenlettel. (8. táblázat).



26. ábra: *Az elisidepsin ölése és kötődése közti különbség a gyógyszer koncentrációjának függvényében*

A431 sejteket hat különböző koncentrációban (a jobboldali ábrarészen A-0,36 μM , B-1 μM , C-2,5 μM , D-5 μM , E-10 μM , F-44 μM) kezeltünk az elisidepsin OregonGreen488 fluorofórral jelölt és jelöletlen változatának 1:4 arányú elegyével. A mintákhoz 10 $\mu g/ml$ propidium-jodid is került a sejtek pusztulásának detektálása végett. A 20 perces kezelési időt követően a mintákat mostuk, majd Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal (60x, NA=1,35) vizsgáltuk.

A felvételeken egyrészt kiszámítottuk a propidium-jodid pozitív, vagyis a halott sejtek arányát, valamint a membránhoz kötődött fluoreszcens elisidepsin összintenzitását. Utóbbihoz a sejteket Matlab szoftverben, a manuálisan indított vízfeltöltéses algoritmus segítségével azonosítottuk. A sejtpusztulásra és a membránhoz történő kötődésre kapott mérési pontok átlagát (melyet három, egymástól független

kísérletből számítottunk) a Hill-egyenlettel illesztettük, amit a bal oldali ábrarészen a folytonos vonalak szimbolizálnak. A pontokhoz tartozó hibák a SEM értékeket jelölik.

	n (95% CI)	K_d (95% CI) (μM)
Kötődés	1,1 (0- 2,7)	5,1 (1,8- 8,8)
PI pozitivitás	3,2 (2,2- 4,2)	10,2 (9,5- 10,9)

8. táblázat: Az elisidepsin kötődési és sejtpusztítási görbéinek Hill-egyenlettel való megillesztése.

Az n a Hill-együttható, amely a kooperativitást jellemzi, egyezményesen az 1 feletti értéket tekintjük pozitívan kooperatív kölcsönhatásnak; a K_d a disszociációs konstans, a kötődés affinitását lehet a segítségével értelmezni.

Ahogy az a 26. ábrán bemutatott konfokális mikroszkópos felvételeken látható, az elisidepsin sokkal alacsonyabb koncentrációban kötődik a sejtmembránhoz, mint ahogy a propidium-jodid pozitivitás megjelenne.

Az ölési görbe esetén látott K_d (IC₅₀) érték megfelel az előzetesen vizsgált félhatásos gátló koncentrációnak. A kapott eredményeink arra engednek következtetni, hogy az elisidepsin sejtekhez kötődése kevésbé kooperatív, azonban sejtpusztító hatását 3,2-es Hill-koefficienssel lehetett illeszteni. A 26. ábrán bemutatott kötődési görbék alapján is látszik a PI pozitivitás meredek emelkedése, ami magas kooperativitásra utal, míg az elisidepsin kötődési görbéje kevésbé meredeken emelkedik az alacsonyabb kooperativitás miatt. A fentiek azt a feltételezést erősítik, hogy a gyógyszer a sejtekhez kötődés következtében oligomerizáción megy keresztül és ez a lépés szükséges a citotoxikus hatáshoz. Az oligomerizáció a különböző, lipid raftokban jelenlevő fehérjék klaszterizációját idézheti elő.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Az epidermális növekedési faktor receptor ligandkötése

Jelen disszertációban a szerkezeti felépítését és élő szervezetekben betöltött szerepét illetően részletesen feltárt epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) funkciójának átfogó vizsgálata történt meg. Olyan kísérleti rendszereket dolgoztunk ki, amelyek alkalmazásával lehetővé vált a ligandkötődés kooperativitásának és affinitásának vizsgálata, valamint ezek membránkörnyezettől és számos, a receptort jellemző tulajdonságtól történő függésének tisztázása.

Érdeklődésünk középpontjában az EGFR homodimerek vizsgálata állt. Ezen struktúrákat több kötőhelyes fehérjekomplexekként értelmezve szükségszerűen felmerül annak kérdése, hogy a ligandkötő helyek között megfigyelhető-e valamilyen allosztérikus kölcsönhatás, kooperativitás, ami mindmáig nem teljesen tisztázott az EGFR-rel kapcsolatban. A kooperativitás jellemzésére legszélesebb körben a Hill-modellt alkalmazzák, ami tökéletesen kooperatív rendszerek illesztésére megfelelő lehet, a Hill-együttható elméletileg a kötőhelyek számával egyezik meg, a disszociációs állandóval pedig kifejezhető a kötődési affinitás. Az EGFR ligandkötési kooperativitásában azonban minden bizonnyal fontos szerepet tölthetnek be a molekuláris részletek, az egyes alegységek konformációváltozásai is, amelyek figyelembe vételére a Hill-modell nem alkalmas.

Kísérletsorozatunkat egy olyan kínai hörcsög ovárium sejtvonalon hajtottuk végre, amely GFP-vel konjugált EGFR-t stabilan kifejez (F1-4 sejtvonal). Az egyensúlyi EGF kötődés meghatározásához elengedhetetlen, hogy a fluoreszcens ligandum csak a sejtmembránban található EGFR-hez kötődjön, ne internalizálódjon, vagyis ne kerülhessen be az intracelluláris térbe. Hogy ezt biztosítani tudjuk, a sejteket jégen inkubáltuk a fluoreszcens EGF adott koncentrációjú jelölő oldatával. Kísérleti rendszerünk megbízhatóságát alátámasztandó áramlási citométerrel megvizsgáltuk 4°C-on az EGF kötődés kinetikáját. Eredményeink alapján elmondható, hogy az egyensúly minden, általunk alkalmazott EGF koncentráció esetén (1-10-100 nM) 1 óránál hamarabb beáll.

További, az EGF-fel történő inkubálás időtartamát vizsgáló kísérleteket is végeztünk. Felmerült, hogy a ligandum hosszabb ideig tartó jelenléte hatást gyakorol-e a

látszólagos kooperativitásra, illetve a 4°C-os inkubálás ellenére képes-e bekerülni az intracelluláris térbe.

Ennek tisztázására A431 sejteket 1 és 24 órán át a fluoreszcens EGF-ből készült jelölő oldatokkal inkubáltunk jégen, ezt követően a mért fluoreszcenciaintenzitásokat a Hill-moddal megillesztve arra jutottunk, hogy a látszólagos kooperativitás az affinitással egyetemben lecsökken a 24 órán át EGF-fel inkubált mintasor esetén ($n_{\text{kontroll}}=1,32$; $K_d_{\text{kontroll}}=4,75$ nM; $n_{24\text{h}}=1,02$; $K_d_{24\text{h}}=5,2$ nM). Konfokális mikroszkópos felvételek kvantitatív kiértékelése alapján megállapítottuk, hogy az 1 óráig tartó, jégen történő fluoreszcens EGF jelenlét nem vezet internalizációhoz, szemben a szintén jégen történő, 24 óráig tartó inkubációval. Elmondható tehát, hogy a ligandum sejtekbe jutása okozhatja az általunk vizsgált, ligandkötődést jellemző paraméterek megváltozását. Ezen kísérletekből nem derül ki, hogy az internalizáció milyen molekuláris változásokat okoz az EGFR-ben. Azonban az egyértelműen látszik, hogy a 24 órás inkubáció a látszólagos kooperativitást jelentősen csökkenti, ezért az EGF kötődés kvantitatív vizsgálata során ez a kezelési kondíció kerülendő.

Számos, a receptort és annak membránkörnyezetét érintő hatás vizsgálata megtörtént. Elsőként a citoskeleton szerepét jártuk körül két, az F-aktin struktúrát megváltoztató kezelés alkalmazásával. A latrunculin-B és a jasplakinolid toxinok egymással ellentétes hatásúak: az előbbi depolimerizálja az F-aktint, az utóbbi fokozza a polimerizációt. A kezelt sejtek egyensúlyi EGF kötését megvizsgálva, majd eredményeinket a Hill-moddal illesztve azt mondhatjuk, hogy az F-aktin depolimerizáció következtében a látszólagos kooperativitás és a kötődés affinitása egyaránt lecsökken a kontroll sejtekhez képest ($n_{\text{kontroll}}=1,24$; $K_d_{\text{kontroll}}=4$ nM; $n_{\text{lat-B}}=1,03$; $K_d_{\text{lat-B}}=8,2$ nM), míg a jasplakinolid kezelés esetén ilyen hatásról nem beszélhetünk ($n_{\text{jaspI}}=1,13$; $K_d_{\text{jaspI}}=4,3$ nM). A toxinok hatásának vizuális megítélésé céljából TRITC-falloidinnel jelöltük a sejtekben található F-aktint, majd konfokális mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Ezen mérések kimutatták, hogy a jasplakinolid nem okozott jelentős változást a mikrofilamentumok mennyiségében a citoplazmában, vagy ami az EGFR szempontjából különösen fontos, a membrán közvetlen környezetében. Ez magyarázhatja azt, hogy a jasplakinolidnak nem volt hatása az EGF kötődés paramétereire. A latrunculin-B hatására azonban meghatározó mértékben lecsökkent a sejtek mikrofilamentum tartalma.

Azt is vizsgáltuk, hogy a receptor glikozilációja hatással van-e a ligandkötés jellegére. Ennek kiderítésére tunicamycinnel kezeltük a sejteket, ami az N-glikozilációt

gátló ágens. A kezelt sejtek EGF kötését negatív látszólagos kooperativitás és alacsony affinitás jellemezte ($n_{\text{kontroll}}=1,24$; $K_d_{\text{kontroll}}=4 \text{ nM}$; $n_{\text{tunicamycin}}=0,77$; $K_d_{\text{tunicamycin}}=15 \text{ nM}$). A kezelés EGFR-re kifejtett hatását, vagyis a molekulatömeg csökkenését western blot-tal is sikerült alátámasztani. Azt azonban megjegyezzük, hogy a tunicamycin egy aspecifikus fehérje deglikoziláló szer, vagyis az EGFR-en kívül más fehérjéken is kifejti hatását, így az általunk kimutatott változásokban a membrán más fehérjéinek deglikoziláltsága is szerepet játszhat. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az EGFR extracelluláris doménje erősen glikozilált [93], [94]. Molekuláris dinamikai tanulmányok szerint az EGFR extracelluláris doménjének N-glikozilációja az EGF és a receptor ellen termeltetett antitestek kötődésében, valamint a dimerizációs partnerhez történő kapcsolódás során is fontos szerepet játszik [95], ez alapján nem meglepő, hogy a deglikoziláció a látszólagos kooperativitást lecsökkentette.

A fentiekből következőleg megállapítottuk, hogy mind a receptor citoskeletonhoz történő kihorgonyzódása („confinement”), mind a megfelelő glikoziláltsága szerepet játszik a pozitív látszólagos kooperativitás kialakulásában.

Kísérleteinkkel arra is kerestük a választ, hogy a receptor intracellulárisan elhelyezkedő kináz doménje befolyásolja-e a ligandkötődést. A kináz domén aktív és inaktív konformációit a megfelelő kismolekulákkal, kináz inhibitorokkal lehetőség van stabilizálni. Mi két reverzibilis kismolekulával, az erlotinibbel és a lapatinibbel dolgoztunk, előbbi a kináz aktív, utóbbi az inaktív konformációjához képes kötődni és azt stabilizálni. A kezelt sejtek EGF kötését a receptor expresszió szintjével együtt kívántuk vizsgálni, amit úgy értünk el, hogy az áramlási citométerrel kapott GFP intenzitáshisztogramokat három részre osztottuk (alacsony, közepes és magas szinten expresszálókra), majd ezekben külön-külön került kiértékelésre a fluoreszcens EGF kötődése. A kináz aktív konformációja esetén alacsonyabb látszólagos kooperativitást és erősebb kötődési affinitást tudtunk kimutatni a kontroll mintához képest (a teljes sejtpopuláció esetén $n_{\text{kontroll}}=1,26$; $K_d_{\text{kontroll}}=3,9 \text{ nM}$; $n_{\text{erlotinib}}=0,95$; $K_d_{\text{erlotinib}}=1,9 \text{ nM}$). Ezzel szemben a lapatinib kezelés a látszólagos kooperativitást kevésbé változtatta meg, ellenben a kötődési affinitás alacsonyabbnak adódott ($n_{\text{lapatinib}}=1,2$; $K_d_{\text{lapatinib}}=4,9 \text{ nM}$). Ezekben az eredményekben kívül azt is sikerült kimutatnunk ezekkel a kísérletsorozatokkal, hogy a receptor expressziószintje is befolyásolja a ligandkötődés jellemzőit, ugyanis minden kísérleti kondíció esetén az expressziószint növelésével a látszólagos kooperativitás megemelkedik.

Bár hozzánk hasonlóan más, közelmúltban publikált eredmények is negatív kooperativitást mutattak ki a kináz domén aktív, míg pozitív kooperativitást az inaktív konformáció rögzítése során [59], szükségesnek tartottuk a receptor különböző dimerizációs folyamatainak, valamint a ligandkötés lépéseinek külön-külön történő részletes megismerését. Ehhez egy új, molekuláris modellt dolgoztunk ki. Ebben a modellben az extracelluláris és a kináz domén konformációk egymástól függetlenül jöhetnek létre, vagyis összesen négyféle monomert különböztetünk meg. Az extracelluláris domén zárt és nyitott formája között egyensúly van és feltételezzük, hogy csak a nyitott képes a dimerképzésre és ligandkötésre. A kináz aktív vagy inaktív konformációja miatt kétféle dimer jöhet létre: az aktív kinázú monomerből kiindulva funkcionálisan aktív, aszimmetrikus kináz domén dimerek alakulnak ki, míg inaktív KD-jű monomerekből indulva szimmetrikus, funkcionálisan inaktív kináz dimereket kapunk. A modellben feltételezzük, hogy a két dimertípus eltérő affinitással képes kötni a két, egymást követő lépésben kapcsolódó ligandumot, melyek egyensúlyi állapotait külön egyenletekkel és konstansokkal lehet leírni. Alkalmazkodva a szakirodalomban legelterjedtebb megnevezéshez, mi is szimmetrikus és aszimmetrikus KD dimerekként utalunk az általunk kimutatott, különbözőképpen viselkedő kináz domén dimerekre, bár nem végeztünk molekuláris szerkezet-vizsgáló módszereket a pontos konformáció meghatározására. Mégis, az adott inhibitorral történő kezelés, valamint a kooperativitásban mutatott viselkedés alapján úgy gondoljuk, ezen megnevezések használata elfogadható lehet. A modell szükségszerűen tartalmaz egyszerűsítéseket, melyeket annak érdekében kellett bevezetnünk, hogy a változók számát alacsonyan tarthassuk. Az EGF kötődés minden bizonnyal az általunk leírtnál részletgazdagabban zajlik le a biológiai rendszerekben, ám az imént leírtak miatt kompromisszumok meghozatala volt szükséges.

A modellben szereplő 12 receptortípus egyensúlyi állapota 11 egyenlettel és 9 konstanssal írható le. A kísérleti adatokat tekintve, mivel három kezelés történt (kontroll, erlotinib és lapatinib), és ezek mindegyikében a sejteket 4 populációra osztottuk, ez összesen 12 kísérleti kondíciót jelent. Mivel az egyensúlyi ligandkötődést 13 mérési pontra történő illesztéssel határoztuk meg, ezért az új modellben összesen 156 kísérleti adatpont szerepel. A K_2 - K_9 konstansokkal való illesztés párhuzamosan történt, míg a K_1 , amely az aktív-inaktív kináz egyensúlyi állandója, a kezelésekhez igazodva három különböző értéket vehetett fel. A paraméterek konfidencia intervallumainak megtalálásához az illesztést százszor hajtottuk végre.

A modell sikeresnek bizonyult a kísérleti adatsorok megillesztése terén. Az eredményekből az látható, hogy a kináz inaktív konformációja és az extracelluláris domén zárt formája a preferált ligandum hiányában. A dimerizációs hajlamot tekintve az aszimmetrikus KD dimerek képződése sokkal magasabb affinitással történik ($K_7= 480$ receptor/sejt), mint a szimmetrikus dimereké ($K_4= 36\,900$ receptor/sejt). Az első molekula EGF megkötése szintén eltérő erősséggel történik a kináz konformációjának függvényében: szimmetrikus KD dimerek esetén alacsonyabb ($K_5= 95$ nM), aszimmetrikus KD dimerek esetén magasabb ($K_8= 0,1$ nM) affinitással. A két típusú dimer ligandkötésének kooperativitásáról azt mondhatjuk el, hogy mivel aszimmetrikus KD dimereknél az első ligandum rendkívül magas, ám a második alacsonyabb affinitással kötődik ($K_8= 0,1$ nM; $K_9= 2,96$ nM), negatív kooperativitás állapítható meg. Szimmetrikus KD dimerek ligandkötését pozitív kooperativitás jellemzi, mivel az első ligandum alacsonyabb affinitással kötődik, mint a második ($K_5= 95$ nM; $K_6= 0,45$ nM). Összefoglalva az eddigieket, a kináz konformációja döntően befolyásolja az extracelluláris domén funkcióját, vagyis azt nem lehet elhanyagolni az EGF kötődés vizsgálatá során.

Mivel a modellel lehetőség van a különböző receptorspecieszek sejtenkénti számának, valamint a bekötődött ligandum mennyiségének meghatározására is, megadható, hogy az EGF koncentráció, valamint az EGFR expressziószint függvényében mely típusú receptorok milyen mértékben vesznek részt a ligandkötésben az egyes kísérleti körülmények során. Kontroll és lapatinibbel kezelt sejtek esetén a legnagyobb mennyiségben előforduló ligandot kötő receptortípus az inaktív kinázzal rendelkező monomer (EIL). Az expresszió növelésével kezd a dimerek ligandkötéshez való hozzájárulása emelkedni, kontroll esetben elsősorban az aszimmetrikus kináz domén dimereké (DEAL + 2DEA2L), lapatinib kezelés esetén- ahogy azt várjuk- a szimmetrikus kináz domén dimerekből felépülő dimerek részvétele nő meg (DESL + 2DES2L). Levonható az a következtetés is, hogy az aktív kinázzal rendelkező monomer (EAL) nem vesz részt az EGF kötésben egyik kondíció mellett sem, valószínűleg azért, mert azonnal dimerizálódik, amint ligandot köt. Az erlotinib kezelés következtében a ligandum kevésbé kötődik a monomerekhez és expressziószinttől függetlenül az aszimmetrikus kináz dimerekből álló dimerekhez kötődik a ligandum meghatározó mértékben.

Lehetőség van a modell segítségével a kísérleti kondíció, az expresszió valamint a hozzáadott ligandum koncentrációjának függvényében annak vizsgálatára is, hogy milyen mennyiségben található meg a sejteken a 12 receptortípus. Szembetűnik, hogy

alacsony EGF koncentráció mellett is jelen vannak a szimmetrikus KD dimereket tartalmazó dimerek, valamint, hogy magasabb expresszió és hozzáadott ligandum koncentráció esetén sem nő meg a dimerek aránya jelentősebben. Ennek oka abban keresendő, hogy megfigyeléseinket jégen végeztük, ami amellett, hogy biztosítja az internalizáció kizárását, a dimerizációhoz szükséges laterális diffúziós folyamatokat is visszaszorítja. Ezen ellentmondás feloldására mikroszkópos homo-FRET méréseket végeztünk, vizsgálva az EGFR klaszterizációját jégen és 37°C-on, EGF jelenléte mellett vagy annak hiányában. Eredményeink megerősítették kezdeti elképzelésünket, vagyis a hőmérséklet szerepét az EGF-re adott válaszban, mivel a jégen történő stimuláció a ligandummal nem okozott csökkenést a homo-FRET értékekben kontroll és lapatinibbel kezelt sejteknél. Ezzel szemben a 37°C-on történő stimuláció hatására megnőtt a klaszterbe rendeződött EGFR aránya. Az erlotinibbel előkezelt sejteknél megfigyeltük, hogy az EGF már 4°C-on is beindítja a klaszterizációt, ami megegyezik a modell által jósoltakkal. Megjegyezzük, hogy a modellben csak a monomer és dimer formát különböztetjük meg egymástól, míg a homo-FRET nagyméretű klaszterek kimutatására is alkalmas, ezért a modell által leírt dimer EGFR arány közvetlenül nem összehasonlítható a homo-FRET kísérletek során kapott klaszterizálódott receptormennyiséggel, ám azok korrelációja megfigyelhető.

Eredményeink tehát segíthetnek feloldani az EGF kötődés kooperativitását övező ellentmondások egy részét. A kezeletlen mintákon rendre pozitív látszólagos kooperativitást mutattunk ki mindkét vizsgált sejtvonalon, amit az 1 feletti Hill-koefficiens és a Scatchard görbék alakja támaszt alá. Hozzánk hasonlóan más munkacsoportok is beszámoltak pozitív kooperativitásról [54], [55], [56], [57], ahogy ennek az ellentétéről is [80], [96]. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy az utóbbi tanulmányban a miénktől sok szempontból eltérő kísérleti beállításokat alkalmaznak a szerzők, nevezetesen radioaktív ligandummal (^{125}I -EGF) 4°C-on, egy éjszakán át jelölték a sejteket, melyeket aztán lizáltak és gamma-sugármérővel mérték a minták beütésszámát. Úgy gondoljuk, a mi kísérleti rendszerünk jobban összeegyeztethető a sejtek fiziológias körülményeivel, azt pedig kísérletekkel igazoltuk, hogy önmagában a hosszú ideig (24 óra) tartó ligandumjelenlét számottevően befolyásolja az EGF kötődés látszólagos kooperativitását és affinitását, vagyis ezt a kondíciót kerülendőnek tartjuk a kvantitatív EGF kötődés vizsgálata során.

A dolgozat további eredményei közé tartozik annak kimutatása, hogy a pozitív és negatív látszólagos kooperativitásban egyebek mellett a kináz domén konformációjának

is fontos szerepe van. Ezt több munkacsoport is vizsgálta korábban. Coban és munkatársai az EGFR homodimereket tanulmányozták FRET/FLIM (fluorescence-lifetime imaging microscopy- fluoreszcencia-élettartamú képalkotó mikroszkópia) technikával és leírták, hogy a gefitinib, ami aktív konformációban rögzíti a kináz domént, stabilizálja a receptor homodimereket [97]. Hozzánk hasonlóan arra a következtetésre jutottak, hogy az extracelluláris domén mellett a kináz domén foszforilációs állapota egyaránt befolyásolja az EGFR dimerek stabilitását. Macdonald-Obermann és Pike az EGFR extra- és intracelluláris doménje közötti kapcsolatot vizsgálta. Leírták, hogy a lapatinibbel előkezelt sejteken pozitív EGF kötődési kooperativitás áll fenn, ugyanakkor a ligandkötés affinitása alacsonyabb, míg az erlotinib hatására megnő a receptor EGF-el szembeni affinitása [59]. Azt is megállapították, hogy a funkcionálisan aktív, aszimmetrikus kináz domén dimerek létrejötté fontos ahhoz, hogy az erlotinib vagy a lapatinib kifejtsse hatását a ligandummal szembeni affinitásra. Különböző, aktív kináz domén dimereket létrehozni nem képes mutánsokon folytattak vizsgálatokat és azt találták, hogy ezen körülmények között az erlotinib nem növelte, a lapatinib pedig nem csökkentette a receptor affinitását a ligandumra nézve. Eredményeik értelmezéséhez egy olyan modellt alkottak, amelyben az aszimmetrikus KD dimerek extracelluláris doménjeinek nyitott, míg a szimmetrikus KD dimerek extracelluláris doménjeinek zárt konformációt tételeznek fel. Véleményünk szerint ez túlzott leegyszerűsítése az EGFR rendszer folyamatainak, ugyanis a szimmetrikus, inaktív kinázt tartalmazó monomerek és dimerek is képesek a ligandkötésre, ahogy arra eredményeink rávilágítottak.

Az általunk megalkotott molekuláris modellel a korábban közöltektől részletesebb betekintést kaphatunk az EGFR konformációváltozásaiba és ligandkötési folyamataiba. Eredményeink modellel történő megillesztésének egyik tanulsága, miszerint meghatározó mennyiségű ligandumtól független EGFR homodimer található meg a sejteken, egy nemrégiben publikált tanulmánnyal is egybeeseng [58]. Az előbbi közleményben az a megállapítás is olvasható, hogy ezek a ligandumtól független EGFR homodimerek valószínűleg nem az aktív, aszimmetrikus KD dimerekből épülnek fel, ahogy azt mi alá is támasztottuk.

Azt a következtetést is levonhatjuk, hogy az EGFR rendszer csak a kellően magas koncentrációjú ligandumjelenlét hatására aktiválódik, ezzel biztosítva, hogy az „specifikus hatások” ne vezessenek a jelátvitel és a sejtszintű válaszok beindításához. Ezt két tényező segíti elő: (1) ligandum hiányában a kináz domén preferenciálisan az inaktív konformációban van, ami kevésbé alkot dimert; (2) 1-5 nM-os EGF

koncentrációig elsősorban az inaktív, szimmetrikus KD dimerrel rendelkező receptordimerek vannak jelen. Ha a kinázt a megfelelő inhibitorral aktív konformációba helyezzük, akkor azonban már sokkal alacsonyabb EGF koncentráció esetén is beindul a receptor dimerizációja, majd azonnali ligandkötése. Ennek ismeretében, elméleti megközelítésből nézve azt feltételezzük, hogy a klinikumban alkalmazott kináz inhibitorok közül talán nagyobb biztonsággal alkalmazhatóak az inaktív struktúrát rögzítő molekulák, vagyis a lapatinibhez hasonlóak.

6.2. Az elisidepsin sejtekhez kötődésének koncentrációtól és oxigénszinttől való függése

Az elisidepsin egy nemrégiben felfedezett, tumorellenes hatásokat mutató citosztatikum, amely hatásmechanizmusáról kevés ismeret áll rendelkezésre. Leírták, hogy az elisidepsin a plazmamembránban a lipid kettősréteg átrendeződéséhez és fokozott membrán-permeabilitáshoz vezet [74]. Szintén vizsgálták az oxigént igénylő zsírsav-2-hidroxiláz enzim termékeinek, a 2-hidroxi zsírsavaknak a szerepét a gyógyszer működése szempontjából. Kimutatták, hogy a 2-hidroxi zsírsavak fokozott szintézise a gyógyszerrel szembeni megnövekedett érzékenységhez vezet, míg a zsírsav-2-hidroxiláz kifejeződésének gátlása érzéketlenebbé tette a sejteket az elisidepsinre nézve [75]. Ezek alapján szerettük volna vizsgálni az elisidepsin oxigénszinttől függő hatékonyságát, az általunk gyakran alkalmazott biofizikai módszerekkel.

Első lépésként kollégáim meghatározták néhány, a munkacsoport által gyakran használt sejtvonal elisidepsinre vonatkozó félhatásos gátló koncentráció (IC_{50}) értékét normoxiában, valamint 4 napon át hypoxiás (1% oxigént tartalmazó) gázkörnyezetben tenyésztett sejtmintákon. Bizonyos sejtvonalak (A431, CHO, HaCaT, HeLa) kevésbé érzékenyek bizonyultak a gyógyszerrel szemben, esetükben az oxigénmegvonás tovább csökkentette az érzékenységet. Más sejtvonalak (MCF-7, MDA-MB-543, SKBR-3) sokkal szenzitívebbek az elisidepsinnel szemben, ami hypoxiás tenyésztés esetén sem csökkent.

Az elisidepsin sejtekhez történő kötődésének vizuális megítélése céljából konfokális mikroszkópos megfigyeléseket végeztünk A431 és SKBR-3 sejtvonalon. A gyógyszer fluoreszcens és jelöletlen változatának 1:4 arányú elegyével kezeltük a 4 napon át hypoxiában, valamint normoxiában tenyésztett mintákat. A készített felvételeken az látható, hogy az A431 sejtekhez az elisidepsin csak normoxiás gázkörnyezetben történő tenyésztés esetén kötődik, míg hypoxiában szinte egyáltalán nem, vagyis ahogy az IC_{50}

értékek alapján is vártuk, ez a sejtvonal elveszti érzékenységét a gyógyszerre nézve, oxigénmegvonás esetén. Az SKBR-3 sejtvonalnál azonban mind hypoxiás, mind normoxiás tenyésztés esetén megfigyelhető az elisidepsin sejtekhez kötődése.

Vizsgálódásunkat áramlási citometriás kísérletekkel egészítettük ki, ahol a célunk továbbra is az elisidepsin sejtmembránhoz történő kötődésének tanulmányozása volt. Azt már a mikroszkópos megfigyeléseink során láttuk, hogy a gyógyszer bizonyos idő eltelte után bekerül a citoplazmába, azonban célunk a sejtmembránhoz kötődött elisidepsin intenzitásának meghatározása volt, ezért kidolgoztunk egy eljárást, mellyel ez megbecsülhető. Sikerült kimutatnunk, hogy a hypoxia esetén a gyógyszerrel szemben érzéketlenné váló sejtekhez kevésbé képes az elisidepsin kötődni, vagyis tisztáztuk a tapasztalt csökkent szenzitivitás okát, -a citometria jóvoltából- nagyobb vizsgált sejtszám mellett.

Kerestük a választ arra is, hogy a gyógyszer sejtmembránhoz kötődése és sejtpusztítása kooperatív módon zajlik-e. Vizsgáltuk a koncentrációfüggő kötődést valamint az elpusztított sejtek arányát konfokális mikroszkóppal, a két adatsort pedig külön-külön illesztettük a Hill-egyenlettel. Az elpusztított sejtek tekintetében, vagyis az ölési görbe esetén a Hill-együttható 3,2-nek adódott, ami erős pozitív kooperativitásra utal, megerősítve, hogy a permeabilizáció során az elisidepsin oligomereket képez és más, feltehetően raft lipidek és fehérjék klaszterizációját is előidézheti. A membránhoz kötődés azonban az 1,1-es Hill-koefficiensből következőleg kevésbé kooperatív.

Az elisidepsin szerkezetéhez nagyon hasonló citosztatikum a plitidepsin (Aplidin), szintén a PharmaMar gyógyszercég gyártmánya. A fázis III vizsgálatok során is biztató eredményeket mutató plitidepsin hatásosságát többek között hypoxiás körülmények között is vizsgálták. Az elisidepsinnel ellentétben ez a gyógyszer oxigénhiányos és normoxiás környezetben egyaránt hatásosnak bizonyult a tumorsejtek elpusztításában [98].

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori disszertációm témája két, eltérő szerkezetű és hatással rendelkező fehérje sejtmembránhoz történő kötődésének tanulmányozása különböző modellrendszerekben. Az epidermális növekedés faktor és az elisidepsin nevű citosztatikum működését a sejtmembrán fehérje- és lipid asszociációk létrehozását támogató tulajdonsága egyaránt befolyásolja.

Több kötőhellyel rendelkező asszociációk esetén a ligandum megkötése általában nem véletlenszerű, hanem megfigyelhető a ligandkötő domének közötti kooperativitás. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) homodimerek kapcsán más és más elképzelések láttak napvilágot a kooperativitásra vonatkozólag, köztük egyre több olyan, ami a membránkörnyezet és a receptor bizonyos alegységeinek befolyásoló szerepét is vizsgálja. Több olyan körülményt is azonosítottunk, amely hatást gyakorol az EGFR rendszer kooperativitására: a membránhoz történő kihorgonyzódás, valamint az elégtelen glikoziláció egyaránt negatívvá tette az EGF kötődés kooperativitását, amely kontroll esetben pozitívnak bizonyult. Azt szintén kimutattuk, hogy a receptor expresszió szint befolyásolja a ligandkötést, ugyanis minél több receptor fejeződik ki, annál pozitívabb a kooperativitás.

Egy általunk megalkotott modell segítségével arra is sikerült választ találnunk, hogy az intracelluláris kináz domén konformációi képesek-e befolyásolni a ligandkötő domén funkcióját: különböző inhibitorokkal stabilizáltuk a kináz aktív vagy inaktív konformációját, majd vizsgáltuk az egyensúlyi EGF kötődést. A funkcionálisan aktív, aszimmetrikus struktúrával jellemezhető kináz dimerekből álló receptor dimerek EGF kötése negatívan kooperatív, ugyanis az első ligandum nagyon magas, a második azonban alacsonyabb affinitással kötődik. Ezzel szemben a funkcionálisan inaktív, szimmetrikus kináz dimereknél pozitív ligandkötési kooperativitás állapítható meg. A modell segítségével azt is kimutattuk, hogy az aktív kinázzal bíró monomerek dimerizációs hajlama sokkal erősebb, mint inaktív konformációjú társaiké, továbbá a sejteken jelenlévő receptorspecieszek mennyisége és EGF kötéshez való hozzájárulása szintén meghatározhatóvá vált.

Az elisidepsinnel kapcsolatban megállapítottuk, hogy az oxigénszint döntően befolyásolja a legtöbb sejt vonalra gyakorolt hatását: az oxigénmegvonás következtében tapasztalt alacsonyabb érzékenységet a sejtekhez történő csökkent kötődésnek tulajdonítjuk, melyet több módszerrel is sikerült alátámasztanunk. A gyógyszer

sejtmembránhoz történő kötődése alacsonyabb kooperativitással jellemezhető, ám a membrán permeabilizáció (és így a nekrozis) feltehetően az elisidepsin oligomerizációja és a membrán egyéb lipidjeinek és fehérjeinek klaszterizációja révén megy végbe.

8. SUMMARY

In the current PhD work the binding of two distinct proteins to the cell membrane was investigated in various model systems. The function of the epidermal growth factor receptor and a drug called elisidepsin can be influenced by the membrane's ability to create protein or lipid associations.

In protein associations with multiple ligand binding domains a phenomenon called cooperativity might be observed, so that the binding of molecules is not independent but influenced by interactions among the binding sites. In the case of the epidermal growth factor receptor several different assumptions have been put forward, allowing the membrane environment and the conformation of other protein subunits to influence cooperativity. During our investigations several circumstances were identified that play a role in EGF binding, just like inhibiting the receptor's anchoring to the cytoskeleton or inadequate protein glycosylation: both resulted in reduced cooperativity in contrast to control cells that were characterized by positive cooperativity. Receptor expression level also tends to alter cooperativity: the higher the expression level, the more positive the cooperativity is.

A molecular model for EGF binding was created to find out how the distinct conformations of the intracellular domain can influence the function of the ligand binding domain: by applying kinase inhibitors we could fix the kinase either in the active or in the inactive state, then we examined equilibrium EGF binding. Negative cooperativity was observed in case of dimers with functionally active, asymmetric kinase domain dimers as the binding of the first EGF molecule takes place with higher affinity than that of the second one. In contrast, positive cooperativity was identified when stabilizing the inactive kinase conformation from which dimers with symmetric kinase domain dimers are formed. This model also revealed that monomers with active kinase tend to dimerize with much higher propensity than having the kinase in the inactive state. The amount of receptor species and their contribution to EGF binding were also determined.

We gained information about the mechanism of action of elisidepsin: oxygen level turned out to influence the sensitivity of most studied cell lines: oxygen depletion made cells less sensitive to the drug due to decreased binding, a phenomenon that has been supported by various techniques. Binding of elisidepsin to the cell membrane takes place in a less cooperative manner while permeabilization (that leads to necrosis) induces the oligomerization of the drug and clustering of membrane lipids and proteins.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Epanand, R.M., *Introduction to membrane lipids*. Methods Mol Biol, 2015. **1232**: p. 1-6.
2. Smith, S.M., *Strategies for the Purification of Membrane Proteins*. Methods Mol Biol, 2017. **1485**: p. 389-400.
3. Whitelegge, J.P., *Integral membrane proteins and bilayer proteomics*. Anal Chem, 2013. **85**(5): p. 2558-68.
4. Whited, A.M. and A. Johs, *The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes*. Chem Phys Lipids, 2015. **192**: p. 51-59.
5. M'Baye, G., et al., *Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration*. Biophys J, 2008. **95**(3): p. 1217-25.
6. Zhang, Y., et al., *Ceramide-enriched membrane domains--structure and function*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(1): p. 178-83.
7. Gombos, I., et al., *Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins*. Cytometry A, 2004. **61**(2): p. 117-26.
8. Harder, T., et al., *Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 929-42.
9. Varma, R. and S. Mayor, *GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 798-801.
10. Eggeling, C., et al., *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, 2009. **457**(7233): p. 1159-62.
11. Sevcsik, E. and G.J. Schutz, *With or without rafts? Alternative views on cell membranes*. Bioessays, 2016. **38**(2): p. 129-39.
12. Pike, L.J., *Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*. J Lipid Res, 2006. **47**(7): p. 1597-8.
13. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(6): p. 361-374.
14. Nagy, P., et al., *Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 22): p. 4251-62.
15. Gueguinou, M., et al., *Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids?* Biochim Biophys Acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2603-20.
16. Chen, Q., et al., *High cholesterol in lipid rafts reduces the sensitivity to EGFR-TKI therapy in non-small cell lung cancer*. J Cell Physiol, 2018. **233**(9): p. 6722-6732.
17. Simons, K. and J.L. Sampaio, *Membrane organization and lipid rafts*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a004697.

18. Stefan, M.I. and N. Le Novere, *Cooperative binding*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(6): p. e1003106.
19. Kermode, J.C., *The curvilinear Scatchard plot. Experimental artifact or receptor heterogeneity?* Biochem Pharmacol, 1989. **38**(13): p. 2053-60.
20. Wofsy, C. and B. Goldstein, *Interpretation of Scatchard plots for aggregating receptor systems*. Math Biosci, 1992. **112**(1): p. 115-54.
21. Goldstein, B., *Theory of hapten binding to IgM: the question of repulsive interactions between binding sites*. Biophys Chem, 1975. **3**(4): p. 363-7.
22. Wolburg, H. and J. Bolz, *Ultrastructural organization of slice cultures from rat visual cortex*. J Neurocytol, 1991. **20**(7): p. 552-63.
23. Mayawala, K., D.G. Vlachos, and J.S. Edwards, *Heterogeneities in EGF receptor density at the cell surface can lead to concave up scatchard plot of EGF binding*. FEBS Lett, 2005. **579**(14): p. 3043-7.
24. Goutelle, S., et al., *The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(6): p. 633-48.
25. Wyman, J. and S.J. Gill, *Binding and linkage. Functional chemistry of biological macromolecules*. 1990, Mill Valley, CA: University Science Books.
26. Lemmon, M.A., *Ligand-induced ErbB receptor dimerization*. Exp Cell Res, 2009. **315**(4): p. 638-48.
27. Burgess, A.W., *EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets*. Growth Factors, 2008. **26**(5): p. 263-74.
28. Harris, R.C., E. Chung, and R.J. Coffey, *EGF receptor ligands*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 2-13.
29. Penuel, E., et al., *Structural requirements for ErbB2 transactivation*. Semin Oncol, 2001. **28**(6 Suppl 18): p. 36-42.
30. Varadi, T., et al., *Homo- and Heteroassociations Drive Activation of ErbB3*. Biophys J, 2019. **117**(10): p. 1935-1947.
31. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 395-9.
32. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
33. Ferguson, K.M., et al., *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 507-17.
34. Lemmon, M.A., J. Schlessinger, and K.M. Ferguson, *The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(4): p. a020768.
35. Lu, C., et al., *Structural evidence for loose linkage between ligand binding and kinase activation in the epidermal growth factor receptor*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(22): p. 5432-43.
36. Endres, N.F., et al., *Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor*. Cell, 2013. **152**(3): p. 543-56.

37. Sorokin, A., *Activation of the EGF receptor by insertional mutations in its juxtamembrane regions*. *Oncogene*, 1995. **11**(8): p. 1531-40.
38. Thiel, K.W. and G. Carpenter, *Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19238-43.
39. Red Brewer, M., et al., *The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain*. *Mol Cell*, 2009. **34**(6): p. 641-51.
40. Kovacs, E., et al., *A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor*. *Annu Rev Biochem*, 2015. **84**: p. 739-64.
41. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. *Cell Res*, 2002. **12**(1): p. 9-18.
42. Wee, P. and Z. Wang, *Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(5).
43. Zanetti-Domingues, L.C., et al., *The architecture of EGFR's basal complexes reveals autoinhibition mechanisms in dimers and oligomers*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 4325.
44. Moriki, T., H. Maruyama, and I.N. Maruyama, *Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain*. *J Mol Biol*, 2001. **311**(5): p. 1011-26.
45. Hajdu, T., et al., *Comprehensive Model for Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Binding Involving Conformational States of the Extracellular and the Kinase Domains*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 776.
46. Zhang, X., et al., *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor*. *Cell*, 2006. **125**(6): p. 1137-49.
47. Bublil, E.M. and Y. Yarden, *The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 124-34.
48. Defize, L.H., et al., *A431 cell variants lacking the blood group A antigen display increased high affinity epidermal growth factor-receptor number, protein-tyrosine kinase activity, and receptor turnover*. *J Cell Biol*, 1988. **107**(3): p. 939-49.
49. Ozcan, F., et al., *On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(15): p. 5735-40.
50. Bellot, F., et al., *High-affinity epidermal growth factor binding is specifically reduced by a monoclonal antibody, and appears necessary for early responses*. *J Cell Biol*, 1990. **110**(2): p. 491-502.
51. Macdonald, J.L. and L.J. Pike, *Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(1): p. 112-7.
52. Alvarado, D., D.E. Klein, and M.A. Lemmon, *Structural basis for negative cooperativity in growth factor binding to an EGF receptor*. *Cell*, 2010. **142**(4): p. 568-79.

53. Freed, D.M., et al., *EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics*. Cell, 2017. **171**(3): p. 683-695 e18.
54. Lemmon, M.A., et al., *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer*. EMBO J, 1997. **16**(2): p. 281-94.
55. Teramura, Y., et al., *Single-molecule analysis of epidermal growth factor binding on the surface of living cells*. EMBO J, 2006. **25**(18): p. 4215-22.
56. Chung, I., et al., *Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells*. Nature, 2010. **464**(7289): p. 783-7.
57. Sherrill, J.M. and J. Kyte, *Activation of epidermal growth factor receptor by epidermal growth factor*. Biochemistry, 1996. **35**(18): p. 5705-18.
58. Byrne, P.O., K. Hristova, and D.J. Leahy, *EGFR forms ligand-independent oligomers that are distinct from the active state*. J Biol Chem, 2020.
59. Macdonald-Obermann, J.L. and L.J. Pike, *Allosteric regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor ligand binding by tyrosine kinase inhibitors*. J Biol Chem, 2018. **293**(35): p. 13401-13414.
60. Wang, Z., *ErbB Receptors and Cancer*. Methods Mol Biol, 2017. **1652**: p. 3-35.
61. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. Pharmacol Res, 2014. **79**: p. 34-74.
62. Herbst, R.S. and A. Sandler, *Bevacizumab and erlotinib: a promising new approach to the treatment of advanced NSCLC*. Oncologist, 2008. **13**(11): p. 1166-76.
63. Hsu, J.L. and M.C. Hung, *The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 575-588.
64. Bose, R., et al., *Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer*. Cancer Discov, 2013. **3**(2): p. 224-37.
65. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. Semin Oncol, 2006. **33**(4): p. 369-85.
66. Kwapiszewski, R., S.D. Pawlak, and K. Adamkiewicz, *Anti-EGFR Agents: Current Status, Forecasts and Future Directions*. Target Oncol, 2016. **11**(6): p. 739-752.
67. Zhang, J., P.L. Yang, and N.S. Gray, *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.
68. Roskoski, R., Jr., *Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes*. Pharmacol Res, 2016. **103**: p. 26-48.
69. Wood, E.R., et al., *A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6652-9.
70. Collins, D.M., et al., *Preclinical Characteristics of the Irreversible Pan-HER Kinase Inhibitor Neratinib Compared with Lapatinib: Implications for the Treatment of HER2-Positive and HER2-Mutated Breast Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).

71. Garcia-Rocha, M., P. Bonay, and J. Avila, *The antitumoral compound Kahalalide F acts on cell lysosomes*. *Cancer Lett*, 1996. **99**(1): p. 43-50.
72. Suarez, Y., et al., *Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(9): p. 863-72.
73. Janmaat, M.L., et al., *Kahalalide F induces necrosis-like cell death that involves depletion of ErbB3 and inhibition of Akt signaling*. *Mol Pharmacol*, 2005. **68**(2): p. 502-10.
74. Molina-Guijarro, J.M., et al., *Irvalec inserts into the plasma membrane causing rapid loss of integrity and necrotic cell death in tumor cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19042.
75. Herrero, A.B., et al., *Levels of SCS7/FA2H-mediated fatty acid 2-hydroxylation determine the sensitivity of cells to antitumor PM02734*. *Cancer Res*, 2008. **68**(23): p. 9779-87.
76. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. **14**: p. 111-36.
77. Varadi, T., et al., *ErbB protein modifications are secondary to severe cell membrane alterations induced by elisidepsin treatment*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **667**(1-3): p. 91-9.
78. Nigam, M., et al., *Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean*. *Daru*, 2019. **27**(1): p. 491-515.
79. Brock, R., I.H. Hamelers, and T.M. Jovin, *Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor*. *Cytometry*, 1999. **35**(4): p. 353-62.
80. Pike, L.J., *Negative co-operativity in the EGF receptor*. *Biochem Soc Trans*, 2012. **40**(1): p. 15-9.
81. Wakatsuki, T., et al., *Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 5): p. 1025-36.
82. Bubb, M.R., et al., *Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(7): p. 5163-70.
83. Wang, X.Q., et al., *Epidermal growth factor receptor glycosylation is required for ganglioside GM3 binding and GM3-mediated suppression [correction of suppression] of activation*. *Glycobiology*, 2001. **11**(7): p. 515-22.
84. Soderquist, A.M. and G. Carpenter, *Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(20): p. 12586-94.
85. Kaplan, M., et al., *EGFR Dynamics Change during Activation in Native Membranes as Revealed by NMR*. *Cell*, 2016. **167**(5): p. 1241-1251 e11.
86. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 775-87.
87. Garrett, T.P., et al., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 763-73.

88. Shan, Y., et al., *Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization*. Cell, 2012. **149**(4): p. 860-70.
89. Mi, L.Z., et al., *Simultaneous visualization of the extracellular and cytoplasmic domains of the epidermal growth factor receptor*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 984-9.
90. Stamos, J., M.X. Sliwkowski, and C. Eigenbrot, *Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46265-72.
91. Klein, P., et al., *A structure-based model for ligand binding and dimerization of EGF receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 929-34.
92. Szabo, A., et al., *Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements*. Biophys J, 2008. **95**(4): p. 2086-96.
93. Smith, K.D., et al., *Analysis of the glycosylation patterns of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor expressed in Chinese hamster ovary fibroblasts*. Growth Factors, 1996. **13**(1-2): p. 121-32.
94. Sato, C., et al., *Characterization of the N-oligosaccharides attached to the atypical Asn-X-Cys sequence of recombinant human epidermal growth factor receptor*. J Biochem, 2000. **127**(1): p. 65-72.
95. Azimzadeh Irani, M., S. Kannan, and C. Verma, *Role of N-glycosylation in EGFR ectodomain ligand binding*. Proteins, 2017. **85**(8): p. 1529-1549.
96. Macdonald-Obermann, J.L. and L.J. Pike, *The intracellular juxtamembrane domain of the epidermal growth factor (EGF) receptor is responsible for the allosteric regulation of EGF binding*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13570-6.
97. Coban, O., et al., *Effect of phosphorylation on EGFR dimer stability probed by single-molecule dynamics and FRET/FLIM*. Biophys J, 2015. **108**(5): p. 1013-26.
98. Rockwell, S. and Y. Liu, *Aplidin as a potential adjunct to radiation therapy: in vitro studies*. Int J Radiat Biol, 2010. **86**(1): p. 63-70.

10. TÁRGYSZAVAK

EGF receptor, ligandkötődés, kooperativitás, dimerizáció, kináz domén, elisidepsin

11. KEYWORDS

EGF receptor, ligand binding, cooperativity, dimerization, kinase domain, elisidepsin

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Nagy Péternek a kiváló témavezetést, hasznos elméleti és gyakorlati tanácsait. Diákkörös hallgató korom óta inspirálólag hat rám a tudományos munka iránt személyével és kutatói attitűdjével.

A Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet egykori és jelenlegi igazgatóinak: Prof. Dr. Szöllösi Jánosnak és Prof. Dr. Panyi Györgynek köszönettel tartozom azért, hogy lehetővé tették számomra az intézetben történő magas színvonalú kutatómunka végzését és szakmai szemmel végigkísérték intézeti pályafutásomat.

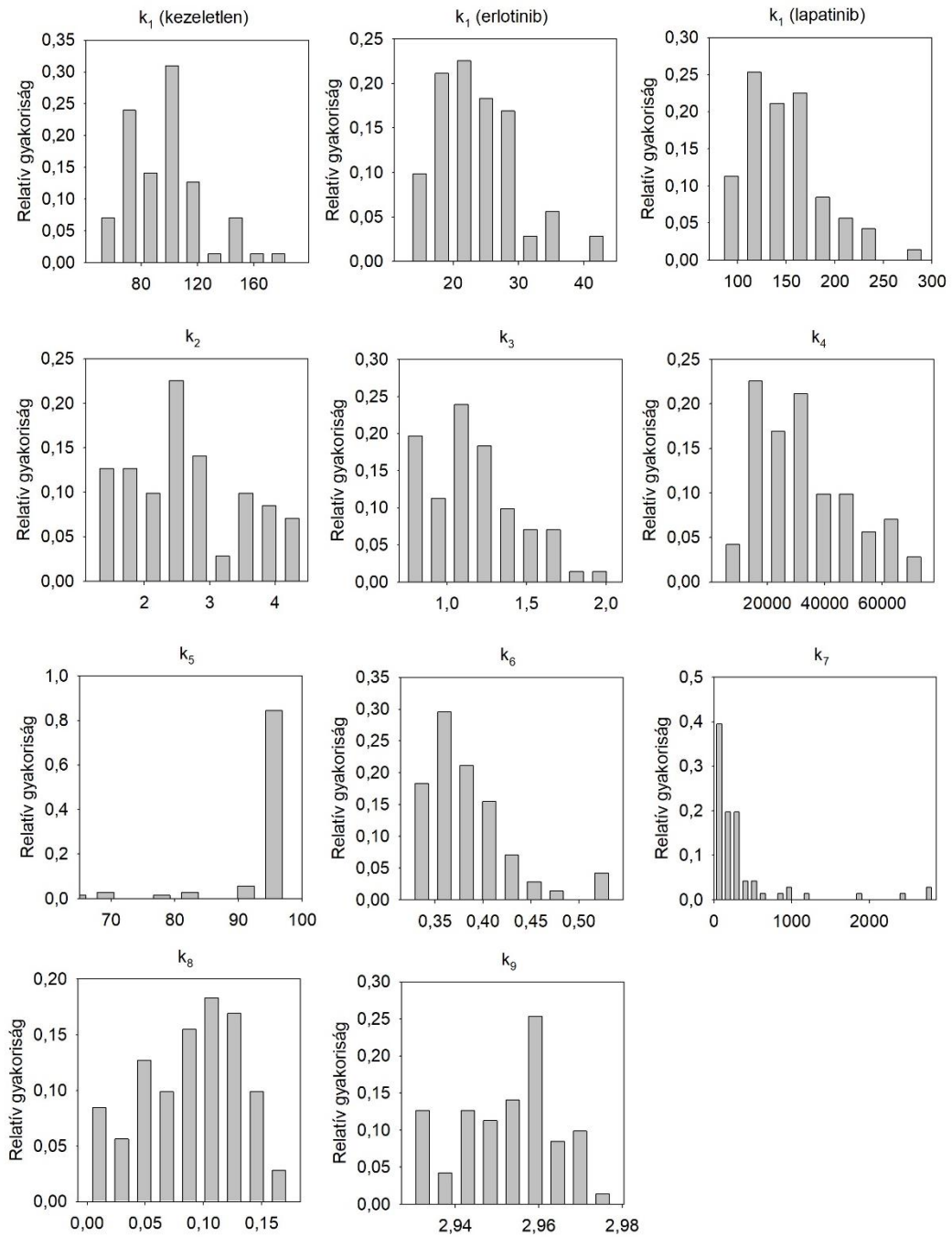
A doktori iskola által számomra kijelölt két tutoromnak, Dr. Szentandrásy Norbertnek és Prof. Dr. Csontos Csillának köszönöm, hogy az évek során figyelemmel kísérték előrehaladásomat, segítették az akadémiai szférában történő kiigazodásomat és beszélgetéseink során bátorítást és inspirációt nyújtottak számomra.

Hálás vagyok munkacsoportunk kutatóinak, külön kiemelve Rebenku Istvánt, Dr. Kovács Tamást és Dr. Váradi Tímeát, hogy hasznos szakmai támogatásukon túl barátként is mellettem álltak.

Külön köszönet Utasi-Szabó Rita, Vágóné Toldi Hajnalka és Szilágyi Anikó asszisztensnőknek a technikai segítségért.

A PhD munka a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs hivatal finanszírozásával valósult meg (K120302, GINOP-2.3.2-15-2016-00020, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009).

13. FÜGGELÉK



27. ábra: A molekuláris modellben szereplő paraméterek eloszlása

A 19. ábrán bemutatott kísérleti adatok százszor kerültek megillesztésre a modellel és a 11 paraméter eloszlása látható a fenti hisztogramokon. A paraméterek konfidencia intervallumait, melyek a 6. táblázatban kerültek bemutatásra, ezen hisztogramok segítségével becsültük meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/17/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hajdu Tímea

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10057524

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hajdu, T.**, Váradi, T., Rebenku, I., Kovács, T., Szöllősi, J., Nagy, P.: Comprehensive Model for Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Binding Involving Conformational States of the Extracellular and the Kinase Domains.
Front. Cell. Dev. Biol. 8, 1-53, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00776>
IF: 5.201 (2019)
2. Király, A., Váradi, T., **Hajdu, T.**, Rühl, R., Galmarini, C. M., Szöllősi, J., Nagy, P.: Hypoxia reduces the efficiency of elisidepsin by inhibiting hydroxylation and altering the structure of lipid rafts.
Mar. Drugs. 11 (12), 4858-4875, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11124858>
IF: 3.512





További közlemények

3. Kovács, T., Batta, G., **Hajdu, T.**, Nagyné Szabó, Á. T., Váradi, T., Zákány, F., Csomós, I., Szöllősi, J., Nagy, P.: The Dipole Potential Modifies the Clustering and Ligand Binding Affinity of ErbB Proteins and Their Signaling Efficiency.

Sci. Rep. 6, 35850, 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35850>

IF: 4.259

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,972

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,713**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.12.

