

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Hajdu Tímea, okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája  
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálmódszerek programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Mádi András, PhD

Dr. Hild Gábor, PhD

A doktori szigorlat (online formátumban) időpontja: 2021. július 7. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Gyimesi Máté, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Mádi András, PhD

Dr. Hild Gábor, PhD

Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Gyimesi Máté, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. július 7. 13:00.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a hajdu.timea@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2021. július 6.) 17 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

## **1. BEVEZETÉS**

### ***1.1. Membrán-mikrodomének, lipidutajok***

A mikrodomének a membrán olyan részterületei, melyek fizikai-kémiai tulajdonságai eltérőek a membrán többi részétől. Vizsgálatukra két alapvető megközelítés létezik: nem ionos detergensekkel történő kezelés során a visszamaradt oldhatatlan frakció elemzése, míg a másik lehetőség a mikrodomének mikroszkópos vizsgálata. Utóbbi módszerekkel kisméretű és időben kevésbé stabil struktúrákat sikerült kimutatni.

A lipidutajok a membrán-mikrodomének talán legfontosabb alcsoportját alkotják. Olyan, kisméretű (10-200 nm), heterogén, dinamikus, szterolokban és szfingolipidekben gazdag domének, melyek csoportokba szervezik a sejt folyamatokat. A kisebb raftok időnként stabilizálódhatnak fehérje-fehérje vagy fehérje-lipid kölcsönhatásokkal, hogy a sejt folyamatok számára nagyobb felületet biztosíthassanak. 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. Az EGFR-ről, a disszertációban vizsgált egyik fehérjéről is kimutatták, hogy foszforilálódott formában a lipid raftokban lokalizálódik.

### ***1.2. Az EGF receptorcsalád***

Az EGF/ErbB receptorcsalád a receptor tirozin-kinázok prototípusának tekinthető: tagjai az EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 és ErbB4/HER4. Fontos szerepet játszanak az intracelluláris jelátviteli folyamatokban, a sejt differenciációban, az apoptózisban, valamint a fiziológiás és patológias sejtosztódásban. Szerkezeti felépítés tekintetében az EGF receptorok mindegyike rendelkezik egy extracelluláris doménnel, ezt

követi az  $\alpha$ -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.

### ***1.3. Az EGFR homodimerizációja***

Az EGF receptorok kiterjedt homo- illetve heteroasszociációs hálózatokat alkothatnak, ami a jelátvitel változatosságát eredményezi. A klasszikus elmélet szerint az EGFR-re a ligandum által kiváltott dimerizációs és aktivációs mechanizmus a jellemző. Ennek értelmében az EGF a receptor extracelluláris doménjének I-es és III-mas doménjéhez kötődik egyszerre, majd a végbemenő konformációváltozások eredményeként szabaddá válik a dimerizációs kar, amely kapcsolódni képes egy szomszédos, szintén aktiválódott EGFR-hez.

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, amelyek kialakításában nem szükségszerűen vesz részt az extracelluláris domén, hanem főként a kináz konformációváltozásainak tulajdoníthatók. Létrejöhet a funkcionálisan aktív, aszimmetrikus kináz domén (KD) dimer egy aktív és egy inaktív konformációjú fogadó kináz kapcsolódásával, továbbá szimmetrikus KD dimerek is megtalálhatóak, melyek funkcionálisan inaktívak és melyekben a két kapcsolódó kináz azonos konformációban van.

### ***1.4. Az EGFR ligandkötésének kooperativitása***

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, akkor pozitív

kooperativitásról beszélünk, ellentétes esetben, azaz ha a második ligandum bekötődése gátolt, negatív kooperativitás áll fenn.

A kooperativitás jellemzésére gyakran használják a Hill-modellt, mely alkalmas a koncentrációfüggő ligandkötődéses vizsgálatok illesztésére. A Hill-együttható értékéből következtetni lehet a kooperativitás jellegére, amennyiben ez 1 felett alakul, pozitív kooperativitás tételezhető fel. A Hill-modell egyik számottevő hiányossága azonban a kötődési folyamatokat övező molekuláris részletek figyelmen kívül hagyása, amik az EGFR kapcsán minden bizonnyal relevanciával bírnak. Épp ezért disszertációmban a Hill-modell alkalmazásával nyert ligandötődési adatokra látszólagos kooperativitásként és affinitásként utalok.

Az EGFR ligandkötése kapcsán a negatív kooperativitás vált a legszélesebb körben elfogadott elképzeléssé, magyarázatot adva az EGF kötődésnél megjelenő heterogenitásra. Ezt szerkezetvizsgálati tanulmányok is megerősítették drosophila modellrendszerben. Az emberi EGFR-t vizsgálva negatív kooperativitást csak abban az esetben tudtak detektálni, ha a ligandum nemcsak az extracelluláris doménhez, hanem a teljes receptorhoz kötődött. Emellett számos, pozitív kooperativitást valószínűsítő irodalommal is találkozhatunk. Ez a megosztottság azt az elképzelést erősíti, hogy az EGFR ligandkötését számos tényező befolyásolhatja, az egyes alegységek (pl. a kináz domén) konformációi, esetleg más struktúrák (pl. citoszkeleton) jelenléte és kölcsönhatásai az EGF receptorral.

### ***1.5. Az EGFR-hez kötődő antitestek, kináz inhibitorok***

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, valamint tumor-ellenes citotoxicitási immunválaszt idéznek elő. A legsikeresebben alkalmazott EGFR ellenes

antitest a cetuximab (Erbitux®), amely egy kiméra egér/humán immunglobulin-G, melyet a klinikumban elsősorban a vastagbélrákos és fejnyci daganatos esetek kezelésére használnak.

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 kináz inhibitorokat csoportosíthatjuk aszerint, hogy a kináz mely konformációjához képesek kötődni. Az I-es típusú inhibitorok a kináz aktív konformációját felismerő ATP analógok, köztük említendő a gefitinib (Iressa®) és az erlotinib (Tarceva®). A II-es típusú inhibitorok a kináz domén inaktív konformációját ismerik fel. Ebbe a csoportba sorolható a lapatinib (Tykerb®) vagy a neratinib (PB272).

### ***1.6. Az elisidepsin, és feltételezett hatásmechanizmusa***

Az elisidepsin egy gyűrűs depsipeptid, mely in vitro körülmények között számos daganat kezelésében bizonyult hatásosnak. Hatásmechanizmusa sok szempontból különbözik az eddig ismert kemoterápiás szerekétől. Irodalmi adatok szerint a lizoszóma membránok felszakadását, sejtmag-fragmentációt és nektrotikus sejthalált okoz. A nektrotikus sejthalál kedvező lehet abból a szempontból, hogy kevesebb lehetőség kínálkozik a gyógyszer iránti rezisztencia kialakulására, azonban figyelembe kell venni az esetleges terápiás felhasználás során, hogy a nekrózis gyulladáshoz is vezethet.

A gyógyszerrel szembeni érzékenység vizsgálata során a zsírsav-2-hidroxiláz enzim került az érdeklődés homlokterébe. A 2-hidroxi zsírsavak fokozott jelenléte növelte a sejtek érzékenységét a gyógyszerrel szemben, míg az enzim gátlásával a szenzitivitás lecsökkent. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a lipidtutajoknak szerepe lehet a gyógyszer hatásmechanizmusában, mivel azok létrehozásában és stabilizálásában fontos szerepet töltenek be a 2-hidroxi zsírsavak.

## 2. CÉLKITŰZÉS

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

- 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 citoskeleton 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.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### *3.1. Sejtvonalak, kezelések és stimulálás EGF-fel*

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 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 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.

A sejtek aktin összetételének megváltoztatását latrunculin-B és jasplakinolid toxinok alkalmazásával érték el, előbbi depolimerizálja az F-aktint, utóbbi fokozza a polimerizációt. A latrunculin-B-t 2 µM koncentrációban adtuk a sejtekhez HBSS oldatban. Az inkubáció 37°C-os hőmérsékleten 10 percig tartott. A jasplakinoliddal 1 µM-os koncentrációban, 37°C-on 30 percig kezeltük sejteket HBSS oldatban.

A tunicamycint, a fehérje N-glikozilációját gátló ágenszt 1 µg/ml koncentrációban adtuk az F1-4 sejtekhez DMEM médiumban, ami a fentiekben leírt komponenseket tartalmazza. A toxin jelenlétében 24 órán át tovább tenyésztettük a sejteket 37°C-os hőmérsékleten.

A sejtek EGF-stimulálása során első lépésként a sejteken 12 órán át tartó szérummegvonást alkalmaztunk, azaz 0,1% FCS-t és 50 µg/ml gentamicint tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük. Ezután az EGF-et 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.

### ***3.2. Sejtek jelölése fluoreszcens EGF-fel és intenzitásmérés áramlási citometriával***

Az EGF kötődési vizsgálatokhoz az EGFR ligandumaként tetrametil-rhodaminnal (TAMRA) konjugált EGF-et használtunk, amelyből 10  $\mu\text{M}$ -os töménységű törzsoldatot készítettünk. A törzsoldatból hígítási sorozat készült 0,5 mg/ml BSA-PBS pufferben úgy, hogy a legtöményebb jelölő oldat készült el elsőként és mindegyik oldat a nála kétszer töményebb mintából került kihígításra. A jelölő oldatokat jégén tartottuk, amelyekhez 20  $\mu\text{l}$  térfogatú, 100 000 db sejtet tartalmazó 4°C-os szuszpenzió került egyenként. A TAMRA-EGF-fel történő inkubáció 1 órán át tartott, végig jégén tárolva a mintákat.

A fluoreszcencia intenzitásméréshez FACS Aria III áramlási citométert használtunk. A TAMRA gerjesztéséhez az 561 nm hullámhosszú lézert használtuk, az emissziót egy 595/50-es sávszűrő segítségével detektáltuk. A F1-4 sejteken kifejeződő GFP-t 488 nm-en gerjesztettük. A műszer mintatartóját 4°C-on termosztáltuk. A citométerrel mintánként 20 000 db sejtet számoltunk le.

### ***3.3. Kezelés elisidepsinnel és sejtenyésztés oxigénhiányos környezetben***

Az elisidepsin sejtmembránhoz kötődésének vizsgálatához a gyógyszer OregonGreen488 fluorofórral konjugált és jelöletlen változatát 1:4 arányban adtuk a sejtekhez. A kezelés végkoncentrációját az adott sejtvonalra meghatározott félhatásos gátló koncentráció függvényében választottuk meg: rendszerint 2  $\mu\text{M}$  vagy 0,5  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban alkalmaztuk az elisidepsint.

A hypoxiás gázkörnyezetet úgy alakítottuk ki, hogy a 8 lyukú Ibidi kamrában vagy sejtenyésztő flakában növesztett sejteket Billups-Rothenberg moduláris hypoxiás kamrába tettük, majd hypoxiás gázkeverékkel gázosítottuk, melynek összetétele: 1%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  és 94%  $\text{N}_2$ . 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.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Az EGFR glikoziláltsága és a citoszeletális hálózat befolyásolja az EGF kötődést

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, 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. Pozitív kontrollként jasplakinoliddal kezeltünk sejteket, mely a latrunculin-B-vel ellentétes hatással rendelkezik, azaz az F-aktin polimerizációját elősegíti. A Hill-moddal történt illesztés eredményei az alábbiak szerint alakultak:  $n_{\text{kontroll}}=1,24$ ;  $K_d_{\text{kontroll}}=4 \text{ nM}$ ;  $n_{\text{lat-B}}=1,03$ ;  $K_d_{\text{lat-B}}=8,2 \text{ nM}$ ;  $n_{\text{jaspl}}=1,13$ ;  $K_d_{\text{jaspl}}=4,3 \text{ nM}$ .

A két ágens mikrofilamentumokra kifejtett hatását konfokális mikroszkópos vizsgálatokkal is alátámasztottuk; 8 lyukú Ibidi kamrában növesztett sejteket latrunculin-B-vel és jasplakinoliddal kezeltünk, majd a sejtmembrán permeabilizációját követően az F-aktint TRITC-falloiddinnel jelöltük. Eredményeink szerint a latrunculin-B hatékonyan depolimerizálja az F-aktint, ugyanakkor a jasplakinolidnak nem volt észlelhető hatása a mikrofilamentumok mennyiségére vagy elrendeződésére.

Kísérleteink során kerestük a választ arra is, hogy az EGFR megfelelő glikoziláltsága szerepet játszik-e az EGF kötődés látszólagos kooperativitásában és affinitásában.

A tunicamycinnel kezelt F1-4 sejtekről megállapítottuk, hogy a kezelés következtében mind a kötődés affinitása, mind a kooperativitása lecsökkent a kontrollhoz képest ( $n_{\text{kontroll}}=1,24$ ;  $K_d_{\text{kontroll}}=4 \text{ nM}$ ;  $n_{\text{tunicamycin}}=0,77$ ;  $K_d_{\text{tunicamycin}}=15 \text{ nM}$ ). 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.

#### ***4.2. Az EGFR kináz doménjének konformációváltozásai hatással vannak az EGF kötődésre***

A további vizsgálataink során kináz 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. A szoftveres elemzés során az EGFR-GFP expresszió alapján három részre osztottuk a sejteket: alacsony, közepes és magas EGFR expresszálo alpopulációkra, melyekben külön-külön értékeltük ki az EGF sejtekhez történő kötődését.

A teljes sejtpopulációkra kapott Hill-illesztések eredményei az alábbiak szerint alakultak:  $n_{\text{kontroll}}=1,26$ ;  $K_d \text{ kontroll}=3,9 \text{ nM}$ ;  $n_{\text{erlotinib}}=0,95$ ;  $K_d \text{ erlotinib}=1,9 \text{ nM}$ ;  $n_{\text{lapatinib}}=1,2$ ;  $K_d \text{ lapatinib}=4,9 \text{ nM}$ . Levonható az a következtetés, hogy az erlotinib kezelés esetén alacsonyabb látszólagos kooperativitást és erősebb kötődési affinitást tudtunk kimutatni a kontroll mintához képest, ezzel szemben a lapatinib nem változtatta meg a kooperativitást, ám a kötődés affinitását lecsökkentette.

#### ***4.3. Az EGF kötődés 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. Annak céljából, hogy az intra- valamint az extracelluláris domén konformációi közötti kapcsolatot feltárhassuk, és molekuláris szinten jellemezzük, 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, azokat a modell nem veszi figyelembe, a független változók minimalizálása érdekében.
- A receptor dimerizációja csak nyitott konformációjú ECD esetén lehetséges.
- A kináz domén két lehetséges konformációja az aktív és az inaktív típus. Megjegyezzük, hogy bár az irodalomban ezektől különböző konformációkkal is találkozhatunk, a modellben, a létrejövő molekulatípusok minimalizálása érdekében az előbbi kettőre kellett szorítkoznunk.
- Az intra- és extracelluláris domének konformációi egymástól függetlenek.
- Két, nyitott konformációban lévő ECD asszociációja esetén a kináz domén szimmetrikus és aszimmetrikus dimereket is képezhet, ahogy arra elektronmikroszkópos eredmények is utalnak. Szimmetrikus KD dimerekben a kináz inaktív konformációban van, míg aktív kinázok figyelhetők meg az aszimmetrikus dimerekben.
- A szimmetrikus és aszimmetrikus KD dimerekből felépülő receptor dimerek eltérő affinitással kötik az EGF-et.
- A ligand csak az ECD nyitott konformációjához képes kötődni.

Az általunk kidolgozott modell 12 molekulatípust foglal magába, melyek egyensúlyi állapotát 11 egyenlet és 9 konstans írja le. Ez a 11 egyenlet felírható egy másodfokú egyenletrendszerként, aminek az ismeretleni a 12

szerepeltetett molekulatípus és a sejtekhez kötődött EGF koncentráció. Az egyenletrendszer Mathematica szoftverrel került megoldásra. A mind a 13 ismeretlenre pozitív eredményt adó megoldást tekintettük a biológiaiailag relevánsnak.

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), összesen 12 kísérleti körülmény került illesztésre a modellel. Az illesztett egyenletek és a kísérleti adatok közötti hiba négyzeteit egy globális algoritmus segítségével minimalizáltuk. A 9 konstans közül csak egy vett fel három különböző értéket ( $K_1$ , az aktív és inaktív KD-k közötti egyensúlyt adja meg) az adott inhibitoros kezelés függvényében, a többi 8 konstanssal párhuzamosan történt meg a 12 kísérleti körülmény megillesztése, ami összesen 156 adatpontot jelent. Matlab szoftverben, a globális kereső algoritmust (Global Search Algorithm) használva sikerült megtalálni a globális minimumokat. Hogy az illesztett paraméterek konfidencia intervallumait meghatározhassuk, az optimalizációs lépést százszor hajtottuk végre.

#### ***4.4. Az EGF kötődés kooperativitásának jellemzése az új, molekuláris modellel***

Az új modellel történt illesztés eredményeiből az látszik, hogy a kináz domén inaktív konformációja a preferált minden olyan kísérleti körülmény során, ahol nem kerül EGF a rendszerhez. 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 (erlotinib kezelés) 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 (lapatinib kezelés) 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.

#### ***4.5. Az EGFR klaszterizációjának függése a hőmérséklettől és a kináz konformációjától***

Az illesztett paramétereket az egyenletekbe behelyettesítve nemcsak a sejtekhez kötődött EGF mennyiségét határozhatjuk meg, hanem az egyes receptorfajták előfordulásának expresszió- és koncentrációfüggését is. Megfigyeltük, hogy az EGF jelenléte nem befolyásolja jelentős mértékben a monomerek és dimerek arányát, ahogy azt is, hogy viszonylag sok, ligandumtól független, előre összeszerelődött dimer található meg a sejteken. A szimmetrikus KD dimerekből felépülő dimerek mennyisége szinte független a hozzáadott EGF mennyiségétől és csak magasabb ligandkoncentráció esetén kezd el csökkenni. A ligandum által kiváltott 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 a 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.

A homo-FRET módszer lényege, hogy ugyanolyan típusú fluorofór a donor és az akceptor, melyek között megoszlik az energia. A homo-FRET kölcsönhatás egyetlen mérhető paramétere a fluoreszcencia anizotrópia megváltozása. Ha csökken a fluorofórok denzitása, csökken a homo-FRET valószínűsége, ezáltal nő a klaszter fluoreszcencia anizotrópiája. A sejtek membránjában kiszámított anizotrópia értékeket a megmaradó GFP fluoreszcencia függvényében ábrázolva megállapítottuk, hogy 4°C-on az EGF stimuláció csak az erlotinibbel kezelt sejteken okozott anizotrópia csökkenést, vagyis váltotta ki a receptor klaszterizációját. Ezzel szemben a kontroll és a lapatinibbel kezelt minták nem mutatnak változást az anizotrópiában az EGF-fel nem stimulált sejtekhez képest. Ezek a megfigyelések egybecsengenek 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.

#### ***4.6. Az elisidepsin sejtekhez kötődése függ az oxigénszinttől***

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 (IC<sub>50</sub>) meghatározásra került kollégáim által normoxiás és hypoxiás tenyésztés esetén. Ezek alapján a sejtvonalakat két típusba sorolhatjuk: az egyik csoportot az elisidepsinre kevésbé szenzitív sejtek (A431, CHO, HaCaT, HeLa) alkotják, 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.

Elsőként konfokális mikroszkópos megfigyelésekkel kívántuk megvizsgálni a gyógyszer sejtekhez kötődését, amelyhez az alábbi két sejtvonalat választottuk: 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.

A normoxiában tenyésztett A431 sejtekhez a fluoreszcens elisidepsin jelentős mértékben kötődött, és a sejtekbe való bejutását is megfigyelhettük. A hypoxiában tenyésztett változat esetén hasonlóan erős fluoreszcenciát nem láttunk. Az SKBR-3 sejtvonalnál mind normoxiában mind hypoxiában történt tenyésztés esetén kötődött az elisidepsin a sejtekhez.

Áramlási citometriás kísérleteink során célunk továbbra is a-hypoxiás tenyésztés esetén néhány sejtvonalnál megjelenő- csökkent érzékenység igazolása volt. A normoxiában és 5 napos hypoxiában tenyésztett sejtek intenzitását az elisidepsin hozzáadását követően kezdtük mérni áramlási citométerrel, a mérés közben eltelt időt is elmentve. Egy általunk kidolgozott módszerrel a kiértékelés során a membránhoz kötődő elisidepsin mennyiségét meg tudtuk határozni, ami alapján azt mondhatjuk, hogy a hypoxia következtében érzéketlenné váló sejtvonalakhoz (A431, CHO, HaCaT, HeLa) az elisidepsin kevésbé képes kötődni.

## 5. MEGBESZÉLÉS

### *5.1 Az epidermális növekedési faktor receptor ligandkötése*

Egyetemi doktori munkám során olyan kísérleti rendszereket dolgoztunk ki, amelyek alkalmazásával lehetővé vált az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) ligandkötődésének vizsgálata. Érdeklődésünk középpontjában az EGF kötődés kooperativitása és affinitása állt, valamint ezek membránkörnyezettől és számos, a receptort jellemző tulajdonságtól történő függésének tisztázása. 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. Ezért disszertációmban a Hill-moddellel nyert ligandkötődéses vizsgálatok eredményeire látszólagos kooperativitásként és affinitásként utalok.

Elsőként a citoszkeleton szerepét jártuk körül két, az F-aktin struktúrát megváltoztató kezelés alkalmazásával. A latrunculin-B és a jasplakinolid toxinok egymással ellenétetes hatásúak: az előbbi depolimerizálja az F-aktint, az utóbbi fokozza a polimerizációt. A kezelt sejtek egyensúlyi EGF kötését megvizsgálva, majd eredményeinket a Hill-moddellel illetve azt mondhatjuk, hogy az F-aktin depolimerizáció következtében a látszólagos kooperativitás és a kötődés affinitása egyaránt lecsökken a kontroll sejtekhez képest, míg a jasplakinolid kezelés esetén ilyen hatásról nem beszélhetünk. A toxinok hatásának vizuális megítélése céljából TRITC-falloiddinnel 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 jaspalakinolidnak nem volt hatása az EGF kötődés paramétereire. A latrunculin-B hatására azonban jelentős 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. 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.

A fentiekből következőleg megállapítottuk, hogy mind a receptor citoskeletonhoz történő kihorgonyozódása („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 (KD) 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 kináz aktív konformációja esetén alacsonyabb látszólagos kooperativitást és erősebb kötődési affinitást tudtunk kimutatni a kontroll mintához képest. Ezzel szemben a lapatinib kezelés a látszólagos

kooperativitást kevésbé változtatta meg, ellenben a kötődési affinitás alacsonyabbnak adódott.

A kísérletsorozatok eredményei alapján szükségesnek tartottuk a receptor különböző dimerizációs folyamatainak, valamint a ligandkötés lépéseinek külön-külön történő részletes megismerését. Ehhez egy új, molekuláris modellt dolgoztunk ki. A modell magában foglalja a kináz domén és az extracelluláris domén egymástól független konformációinak kialakulását, valamint a különböző típusú dimerek létrejöttét és azok ligandkötési lépéseit, ezek mellett azonban szükségszerűen egyszerűsítéseket is be kellett vezetnünk, hogy a paraméterek száma túlzottan ne legyen magas.

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 (amit az aktív kináz konformációjának stabilizálásával érünk el) sokkal magasabb affinitással történik, mint a szimmetrikus dimereké. Utóbbit a kináz inaktív konformációjának stabilizálásával érhetjük el.

Az első molekula EGF megkötése szintén eltérő erősséggel történik a kináz konformációjának függvényében: szimmetrikus KD dimerek esetén alacsonyabb, aszimmetrikus KD dimerek esetén magasabb 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, ezért negatív kooperativitás állapítható meg. Szimmetrikus KD dimerek ligandkötését pozitív kooperativitás jellemzi, mivel az első ligandum alacsonyabb affinitással kötődik, mint a második.

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. Ezen ellentmondás feloldására mikroszkópos homo-FRET méréseket végeztünk, vizsgálva az EGFR klaszterizációját jégen és 37°C-on, EGF jelenléte mellett vagy annak hiányában. Eredményeink alapján a jégen történő stimuláció a ligandummal nem okozott csökkenést a homo-FRET értékekben kontroll és a lapatinibbel kezelt sejteknél. Ezzel szemben a 37°C-on történő stimuláció hatására megemelkedett a receptor klaszterizációja. Az erlotinibbel előkezelt sejteknél megfigyeltük, hogy az EGF már 4°C-on is beindítja a klaszterizációt- ami megegyezik a modell által jósoltakkal.

Eredményeink tehát segíthetnek feloldani az EGF kötődés kooperativitását övező ellentmondások egy részét, ugyanis sikerült rávilágítanunk arra, hogy a pozitív és negatív látszólagos kooperativitásban egyebek mellett a kináz domén konformációjának is fontos szerepe van. Úgy gondoljuk, hogy az EGFR rendszer csak a kellően magas koncentrációjú ligandum jelenlét hatására aktiválódik, ezzel biztosítva, hogy az „aszpecifikus hatások” ne vezessenek a jelátvitel és a sejtszintű válaszok beindításához, ám ha a kinázt a megfelelő inhibitorral aktív konformációba helyezzük, akkor azonban 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.

## ***5.2 Az elisidepsin sejtekhez kötődésének oxigénszinttől való függése***

Az elisidepsin egy nemrégiben felfedezett, tumorellenes hatásokat mutató citosztatikum, amely hatásmechanizmusáról kevés ismeret áll rendelkezésre, az azonban valószínűnek tűnik, hogy a lipidtutajokban dúsuló 2-hidroxi zsírsavak jelenléte, valamint a megfelelő oxigénkoncentráció hatást gyakorolhat működésére. Előzetes vizsgálatok során kollégáim megállapították, hogy a sejtvonalak egy része kevésbé érzékeny a gyógyszerre nézve, amely oxigénmegvonás következtében tovább csökken. Ugyanakkor olyan sejtvonalakat is találtak, melyek sokkal érzékenyebbek az elisidepsinre, oxigénszinttől függetlenül.

Az elisidepsin sejtekhez kötődésének vizuális megítélése céljából konfokális mikroszkópos megfigyeléseket is 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. Az SKBR-3 sejtvonalnál azonban az elisidepsin a két különböző oxigénszintben tenyésztett mintához egyaránt képes kötődni.

Vizsgálódásunkat áramlási citometriás kísérletekkel egészítettük ki, ahol a célunk továbbra is az elisidepsin sejtmembránhoz történő kötődésének tanulmányozása volt.

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.

Összességében tehát az elisidepsin- munkacsoportunk vizsgálatai alapján is- egy biztatónak tűnő gyógyszermolekula jelölt. Optimizmusra okot adó antitumor hatásának és terápiás indexének köszönhetően fázis-II vizsgálatok keretein belül vizsgálták.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori disszertációm témája két, eltérő szerkezetű és hatással rendelkező fehérje sejtmembránhoz történő kötődésének tanulmányozása. 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. Munkám során több olyan körülményt is azonosítottam, amely hatást gyakorol az EGFR rendszer kooperativitására: a membránhoz történő kihorgonyzódás hiánya valamint az elégtelen glikoziláció egyaránt negatívvá tette az EGF kötődés kooperativitását, amely kontroll esetben pozitívnak bizonyult.

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, ezzel szemben a funkcionálisan inaktív, szimmetrikus kináz dimereknél pozitív ligandkötési kooperativitás állapítható meg.

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

## 7. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1., Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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 alapján 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 alapján szolgáltató 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.

