

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

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

**Váradi Tímea Erzsébet**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

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

**Váradi Tímea Erzsébet**

**Témavezető: Dr. Nagy Péter**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2012**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család.....</i>	<i>2</i>
2.2. <i>Az ErbB receptorcsalád szignalizációs folyamatai.....</i>	<i>5</i>
2.3. <i>Az ErbB fehérjék szerepe mellrákban, molekuláris daganatterápia.....</i>	<i>7</i>
2.4. <i>Antitestterápia, specifikus tirozin kináz inhibitorok .....</i>	<i>8</i>
2.4.1. <i>ErbB2 ellenes monoklonális antitestek .....</i>	<i>8</i>
2.4.2. <i>ErbB1 ellenes monoklonális antitest .....</i>	<i>9</i>
2.4.3. <i>ErbB1 tirozinkináz gátlók .....</i>	<i>9</i>
2.5. <i>Trastuzumab hatásmechanizmusa.....</i>	<i>10</i>
2.6. <i>Trastuzumab rezisztencia .....</i>	<i>12</i>
2.7. <i>A CD44 molekula szerkezete és funkciója.....</i>	<i>13</i>
2.8. <i>A hialuronsav szerepe a tumor progresszióban és az ErbB2 maszkírozásában... </i>	<i>13</i>
2.9. <i>Az elisidepsin molekuláris hatásmechanizmusa .....</i>	<i>14</i>
2.10. <i>Molekuláris asszociációk szerepe és azok vizsgálata .....</i>	<i>16</i>
2.11. <i>Lipid tutajok szerkezete, biológiai funkciói.....</i>	<i>21</i>
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>25</b>
4.1. <i>A kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak és plazmidok.....</i>	<i>25</i>
4.2. <i>RNS interferencia.....</i>	<i>26</i>
4.3. <i>Alkalmazott antitestek és vegyületek.....</i>	<i>27</i>
4.4. <i>Western blot analízis .....</i>	<i>27</i>
4.5. <i>Életképesség vizsgálatok.....</i>	<i>28</i>
4.6. <i>Életképesség vizsgálatok statisztikai elemzése.....</i>	<i>29</i>
4.7. <i>Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések.....</i>	<i>29</i>
4.8. <i>Konfokális mikroszkópos vizsgálatok .....</i>	<i>32</i>
4.9. <i>Fluoreszcencia anizotrópia és generalizált polarizáció mérések.....</i>	<i>32</i>
4.10. <i>Páciensek, humán metszet minták.....</i>	<i>34</i>
4.11. <i>Metszetek jelölése és azok vizsgálata konfokális mikroszkóppal.....</i>	<i>34</i>
4.12. <i>Képanalízis, statisztikai kiértékelés.....</i>	<i>36</i>
4.13. <i>Sejtek aktiválása EGF-fel .....</i>	<i>36</i>
4.14. <i>Oligonukleotiddal jelölt antitestek (proximitás próbák) készítése.....</i>	<i>36</i>
4.15. <i>PLA vizsgálata konfokális mikroszkóppal.....</i>	<i>37</i>
4.16. <i>Sejtek jelölése „in situ” PLA vizsgálatokhoz.....</i>	<i>37</i>
4.17. <i>PLA mérések és kiértékelésük.....</i>	<i>38</i>
<b>5. Eredmények és megbeszélésük.....</b>	<b>39</b>
5.1. <i>Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata .....</i>	<i>39</i>
5.1.1. <i>Az ErbB1-3 expresszió nem befolyásolja a CHO és az A431 sejtek elisidepsin iránti érzékenységet.....</i>	<i>39</i>
5.1.2. <i>Az elisidepsin specifikusan megnövelte egy konformáció-szenzitív ErbB3 ellenes antitest kötődését.....</i>	<i>46</i>
5.1.3. <i>Az elisidepsin csökkentette az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációját .....</i>	<i>49</i>
5.1.4. <i>Az elisidepsin megváltoztatta az ErbB3 és a lipid tutaj fehérjék (GPI-horgonyzott GFP, PLAP) eloszlását .....</i>	<i>51</i>
5.1.5. <i>Az elisidepsin a plazmamenbrán rendezettségében okoz változást.....</i>	<i>54</i>

5.2.	<i>Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban...</i>	58
5.2.1.	A páciensekben a trastuzumab kötődését a magas hialuronsav képződés meggátolja .....	58
5.2.2.	A hialuronidáz enzimes emésztés „leleplezi” az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját.....	61
5.2.3.	A FRET nem okozza a trastuzumab kötődés és a hialuronsav sűrűsége közötti negatív korrelációt.....	62
5.2.4.	A trastuzumab kötődés és a hialuronsav sűrűség közötti negatív korreláció tipikusan jelen van egyedi minták esetében is .....	64
5.3.	<i>A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata.....</i>	65
5.3.1.	Kezdeti észrevételek a FRET és a PLA közötti korreláció hiányáról .....	65
5.3.2.	A FRET és a PLA különböző függése a fehérje expressziós szinttől az ErbB2 homoasszociációjának mérésekor.....	67
5.3.3.	A FRET és a PLA különböző függése az expressziós szinttől intramolekuláris mérések esetében.....	70
5.3.4.	Az antitestek sűrűsége nagyban befolyásolja a FRET és PLA méréseket ...	72
5.3.5.	A PLA telítődési jelenségét az RCA reakció időtartama nem befolyásolja szignifikánsan .....	74
6.	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>76</b>
6.1.	<i>Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata .....</i>	76
6.2.	<i>Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban...</i>	77
6.3.	<i>A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata.....</i>	78
7.	<b>Az eredmények kritikai elemzése orvos-biológiai szempontból .....</b>	<b>79</b>
8.	<b>Summary .....</b>	<b>81</b>
8.1.	<i>Investigations in the mechanism of action of elisidepsin .....</i>	81
8.2.	<i>Trastuzumab binding is inhibited in patients with high hyaluronan production.</i>	82
8.3.	<i>Quantitative properties of the PLA method.....</i>	83
9.	<b>Referenciák .....</b>	<b>84</b>
10.	<b>Közlemények.....</b>	<b>91</b>
10.1.	<i>Az értekezéshez felhasznált publikációk.....</i>	91
10.2.	<i>Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikáció .....</i>	91
10.3.	<i>Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és előadások .....</i>	91
11.	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>93</b>
12.	<b>Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai .....</b>	<b>94</b>

## Rövidítések és kémia nevek jegyzéke

- ADCC:** antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (antitest-közvetítette sejtfüggő citotoxikus reakció)
- BP:** band-pass filter (sávszűrő)
- DMSO:** dimetil-szulfoxid
- dNTP:** deoxinukleozid trifoszfát
- ECD:** extracelluláris domén
- ECM:** extracelluláris mátrix
- EDTA:** etilén-diamin tetraacetát
- EGF:** epidermal growth factor (epidermális növekedési faktor)
- eGFP:** enhanced GFP (javított (fluoreszcenciájú) GFP)
- ER:** endoplazmatikus retikulum
- EMT:** epithelial-mesenchymal transition (epiteliális-mezenchimális átmenet)
- FA2H:** fatty acid 2-hydroxylase (zsírsav 2-hidroxiláz)
- FBS:** fetal bovine serum (fetális borjú savó)
- FCS:** fluorescence correlation spectroscopy (fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia)
- FISH:** fluorescence *in situ* hybridization (fluoreszcens *in situ* hibridizáció)
- FRET:** fluorescence resonance energy transfer (fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer)
- GFP:** green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
- GP:** generalizált polarizáció
- GPI:** glikozil-foszfatidil-inozitol
- HABC:** hyaluronic acid binding complex
- HEPES:** (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HLA-I:** humán leukocita antigén-I
- HRG:** heregulin
- IC<sub>50</sub>:** half maximal inhibitory concentration (félhatásos gátló koncentráció)
- IGFR:** insulin-like growth factor receptor (inzulin-szerű növekedési faktor receptor)
- Laurdan:** 6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine
- LP:** long-pass filter (felüláteresztő szűrő)
- MAPK:** mitogén-aktivált protein kináz
- 4-MU:** 4-metilumbelliferon
- mYFP:** monomer YFP
- PAI-1:** plasminogen activator inhibitor-1

**PBS:** phosphate buffered saline (foszfát pufferelt só)

**PCR:** polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)

**PI:** propidium-iodid

**PI3K:** foszfatidil-inozitol-3-kináz

**PLA:** proximity ligation assay (proximitás ligációs vizsgálat)

**PLAP:** placental alkaline phosphatase (placentális alkalikus foszfatáz)

**PTEN:** foszfatáz- és tenzinhomológ gén

**PVDF:** polyvinylidene fluoride (polivinilidén fluorid)

**r:** fluoreszcencia anizotrópia

**RCA:** rolling circle amplification (gördülő ciklikus amplifikáció)

**SANH:** succinimidyl 4-hydrazinonicotinate acetone hydrazone

**shRNS:** „short hairpin” RNS

**THF:** tetrahydro-furán

**TGF- $\alpha$ :** transforming growth factor- $\alpha$  (transzformáló növekedési faktor- $\alpha$ )

**TMA-DPH:** 4<sup>+</sup>-(trimethylammonio)-diphenylhexatriene (4<sup>+</sup>-(trimetilammónium)-difenil-hexatrién)

**TSP-1:** thrombospondin-1

**VEGF:** vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotél növekedési faktor)

**WST:** water-soluble tetrazolium salt (vízben oldódó tetrazólium só)

**YFP:** yellow fluorescent protein (sárga fluoreszcens fehérje)

## **Tárgyszavak**

- elisidepsin, ErbB proteinek, lipid tutajok, folyadék rendezett domének, citotoxicitás, FRET, konfokális mikroszkópia
- emlődaganat, ErbB2, trastuzumab rezisztencia, hialuronsav, epitóp maszkírozás
- proximitás ligációs vizsgálat (proximity ligation assay, PLA), fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET), áramlási citometria, fehérje asszociáció

## **Keywords**

- elisidepsin, ErbB proteins, lipid rafts, liquid ordered domains, cytotoxicity, FRET, confocal microscopy
- breast cancer, ErbB2, trastuzumab resistance, hyaluronan, epitope masking
- proximity ligation assay (PLA), fluorescence resonance energy transfer (FRET), flow cytometry, protein associations

## **1. Bevezetés**

A fejlett országokban a rosszindulatú daganatok a halálozási lista élén járnak, ezen belül is az emlőrák a nők körében az egyik leggyakoribb rákfajta. A daganatok hatékony kezelése még napjainkban is nagy problémát jelent a klinikumban. Jelenleg számos módszer áll rendelkezésre, de ezek önmagukban nem elég effektívek és a mellékhatások is igen számottevőek, ezért aktuális cél kevés mellékhatással rendelkező gyógyszerek kifejlesztése. Ilyen molekulák megtalálásának egyik módja az adott vázmolekula természetben található élőlényekből történő izolálása és karakterizálása. Az elisidepsint így találták meg, és daganatellenes hatását most is széleskörben vizsgálják, ugyanis teljesen egyedi mechanizmusa van az eddig vizsgált kemoterápiás szerekhez viszonyítva. Feltételezések szerint a drog nekrotikus sejthalált okoz, membránkárosodással társítva. Más indirekt bizonyítékok alapján az ErbB tirozin kináz receptorok és a lipid tutajok játszanak szerepet az elisidepsin hatásmechanizmusában, ezért fő célkitűzésünk az volt, hogy a gyógyszer hatását vizsgáljuk az ErbB fehérjék és lipid tutajok eloszlására és szerkezetére, valamint különböző ErbB receptorokat kifejező sejtvonalak elisidepsin érzékenységét hasonlítsuk össze.

Az emlőkarcinómák 20-30%-a fokozott ErbB2 expressziót mutat, ami rossz prognózissal társul [1]. A trastuzumab (Herceptin) volt az első humanizált ErbB2 ellenes monoklonális antitest, amit az előrehaladt állapotú emlődaganatok kezelésére használtak. A kedvező klinikai eredmények ellenére egy éven belül trastuzumab-rezisztencia alakult ki azoknál a betegeknél is, akik kezdetben válaszoltak a terápiára. Mivel a munkacsoport korábbi állatkísérletes eredményei szerint a rezisztencia egyik lehetséges oka az ErbB2 trastuzumab kötő epitópjának hialuronsav általi maszkírozása, vizsgálni kívántuk a hialuronsav molekula szerepét az ErbB2 maszkírozásában humán tumormintákon.

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

## **2. Irodalmi áttekintés**

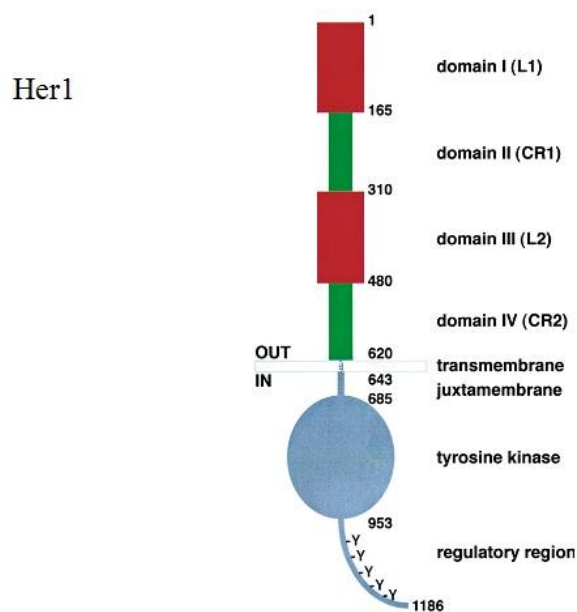
### **2.1. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család**

Az EGFR transzmembrán receptor tirozinkináz I. típusú családnak négy tagja ismert: ErbB1 (EGFR/Her1), ErbB2 (Her2/Neu), ErbB3 (Her3) és ErbB4 (Her4). Jelentős szerepet játszanak számos jelátviteli kaszkád beindításában, a tumoros transzformáció kialakulásában és daganatok növekedésében. Míg az ErbB1 és az ErbB2 mezenchimális szövetekben is kifejeződik, addig az ErbB3 és az ErbB4 inkább csak az epiteliális sejtekre jellemző. Kulcsfontosságú szerepet játszanak a korai embrionális fejlődésben, azon belül is a szívfejlődésben, mivel az ErbB2 és az ErbB4 a szívizomban, az ErbB3 pedig a szívbillentyűk izomsejtjeiben expresszálódik, így szükségesek az egészséges szív kifejlődéséhez, valamint az emlő mirigyek megfelelő működéséhez [2]. Elengedhetetlenek a központi és a perifériás idegrendszer kialakulásában [3], de mutációjuk, sejt felszíni túlzott kifejeződésük, rákos transzformációhoz vezethet [4].

Az ErbB receptorok kiterjedt homo- és heteroasszociációs hálózatot alakítanak ki. A molekulacsalád egyes tagjainak viselkedése eltér egymástól, de általánosságban elmondható, hogy stimulálatlan sejtekben is asszociált állapotban helyezkednek el, majd ligandum hatására ezen klaszterek átrendeződnek (a ligandumokról részletesen lásd 2.2. alfejezet). Az ErbB1 stimulálatlan állapotban kisméretű homoklasztereket alkot, melyek mérete aktiváció hatására nő [5]. Az ErbB2-nek nincs ismert liganduma. A heterodimerizációra hajlamos konformáció a fehérje stimulálatlan állapotában is megfigyelhető, ezzel magyarázható, hogy a többi ErbB fehérje kitűnő heterodimerizációs partnere [6]. Aktiválatlan állapotban nagyméretű homoklasztereket alkot, amelyekben sok az inaktív ErbB2, majd aktiváció hatására az ErbB2 elhagyja ezeket a nagy klasztereket [7]. Az ErbB3-nak nincs tirozinkináz aktivitása, ezért csak heterodimer (pl. ErbB2-vel) szerkezetben tud aktiválódni [8]. Irodalmi adatok alapján az ErbB3 stimulálatlanul homoaggregátumokat alkot. Az ErbB4 hasonlóan az ErbB3-hoz elsődlegesen az ErbB2-vel képez dimert [9].

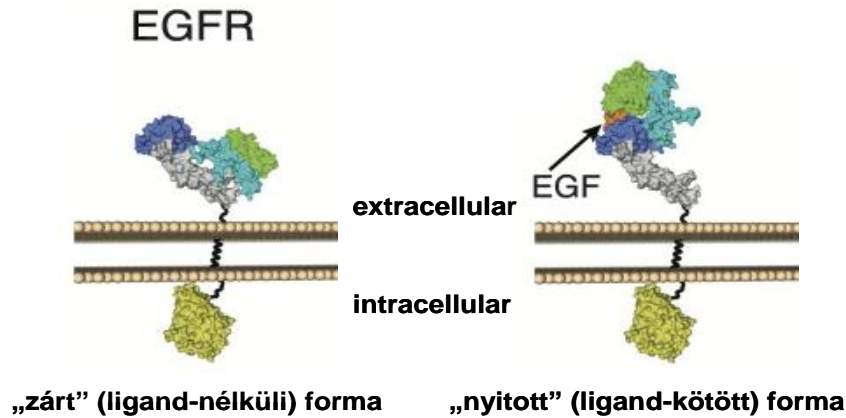
A négy transzmembrán receptor szerkezete és funkciója igen nagy hasonlóságot mutat. Az ErbB1 fehérje felépítése látható az **1. ábrán**. Az extracelluláris rész 620 aminosavból épül fel, négy doménból áll, melyek közül kettő leucinban, kettő pedig ciszteinben gazdag. A leucinban gazdag szubdomének (L1/I és L2/III) képesek a ligandum megkötésére, míg a ciszteinben gazdagok (CR1/II/S1 és CR2/IV/S2) a receptor dimerizációjában játszanak fontos szerepet. A két fő alegységet egy 23 aminosavas,  $\alpha$ -helikális szerkezetű transzmembrán domén köti össze, amelynek lényeges szerepe van a ligandum kötése utáni konformáció-

változás áttekintésében az extracelluláris doménektől az intracellulárisokhoz. A transzmembrán szegmenshez kötődik intracellulárisan a 40 aminosavból álló juxtamembrán domén, majd ezt követi a foszforilálható tirozinkináz domén, mely különböző jelátviteli útvonalak szabályozásában játszik fontos szerepet. A C-terminális végen találhatóak a foszfortirozint kötő effektor molekulák kötőhelyei [10, 11].



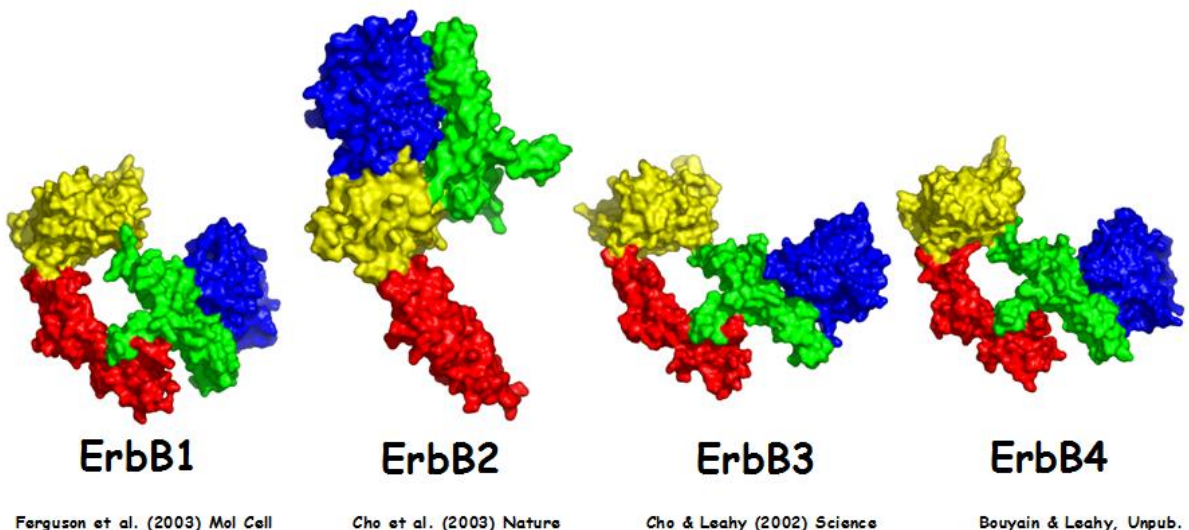
1. ábra: A *Her1* szerkezete (Burgess, *Molecular Cell*, 2003, 12(3):541-52.)

Az ErbB3 receptor tirozinkináz doménje inaktív a kináz doménben lévő aminosav szubsztitúció miatt [11]. Az EGFR és az ErbB3 extracelluláris részének két konformációja ismert (2. ábra): az egyik, ún. „nyitott” konformáció akkor stabilizálódik, amikor ligandum kötődik a receptorhoz. A másik, ún. „zárt” konformációban az I-es és III-as domének közötti ligandum kötő zseb bezáródik. Ebben a konformációban a receptor nem képes ligandumot kötni, és ezt az állapotot egy, a II-es és IV-es domének közötti intramolekuláris híd stabilizálja [12]. Az egyik elmélet szerint a ligandum kötődés indukálja a zárt konformáció nyíltba való átmenetét, más elképzelések szerint pedig a receptor konformációja állandóan fluktuál a zárt és a nyitott állapot között, és a ligandum kötődése csak stabilizálja a nyitott konformációt.



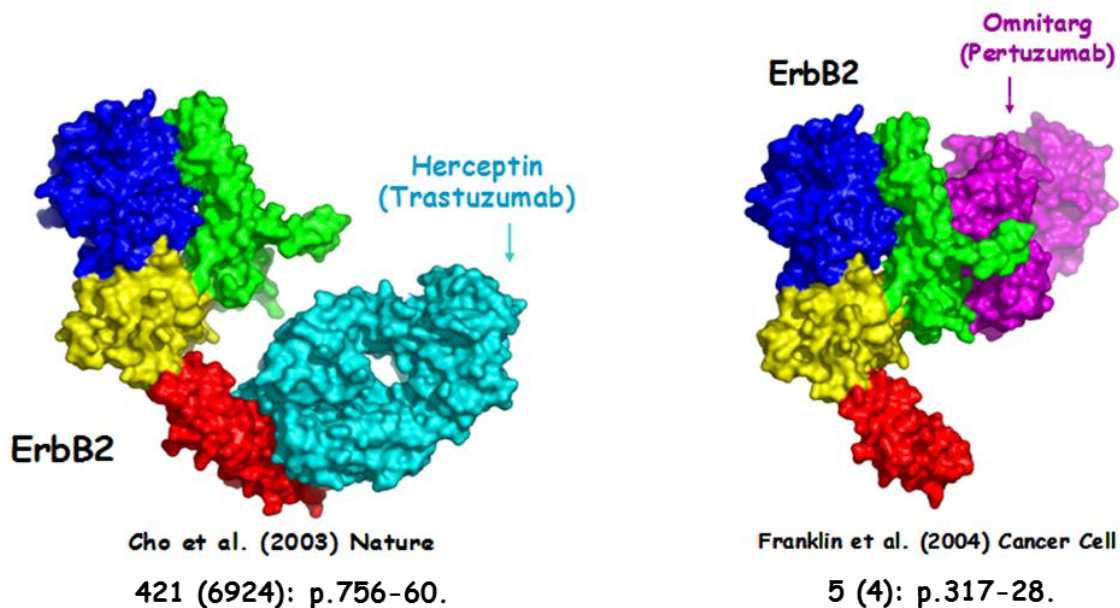
2. ábra: Az EGFR konformáció változása (Franklin, *Cancer Cell*, 2004, 5 (4):317-28.)

Az ErbB2 fehérje eltér a család többi tagjától (3. ábra), ugyanis az extracelluláris ligandum kötő domének által képzett ligandkötő zseb túl kicsi. Az ErbB2-nek a mai napig nincs ismert fiziológiás liganduma, ezért csak heterokomplexben képes jelátviteli útvonalak aktiválására [13]. Az ErbB2 extracelluláris doménje (ECD) a feltételezések szerint mindig „nyitott” állapotban van, még monomer formában is, ami megmagyarázhatja, hogy miért ez a molekula a kedvelt dimerizációs partnere a család másik három tagjának (preferenciálisan az ErbB3-nak). Elektrosztatikus taszítás miatt homodimerizációja csak akkor figyelhető meg, ha a sejtek felszínén túlzottan expresszálódik, vagy mutáció van jelen a transzmembrán doménjében.



3. ábra: Az ErbB receptorok extracelluláris doménjeinek szerkezete

Mára már viszonylag sok kristályszerkezeti adat áll rendelkezésünkre az EGFR család tagjairól, de ezek főleg az extracelluláris domén egy részére és az intracelluláris kináz doménre vonatkoznak. Ezekből a receptorok működésére lehet következtetni, de pontosabb megértésükhöz elengedhetetlen a receptor teljes szerkezetének ismerete. Emellett ismertek még az ErbB2 immunterápiában használt antitestekkel képzett komplexeinek kristályszerkezeti adatai is, így a trastuzumab (Herceptin™) [14] és a pertuzumab (Omnitarg™) [15] antitestek pontos kötődési helyét is feltárták már (4. ábra).



4. ábra: Terápiában használt antitestek kötődési helye az ErbB2 különböző epitópjaihoz

## 2.2. Az ErbB receptorcsalád szignalizációs folyamatai

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

Az ErbB receptorok ligandumai lehetnek membránba integrált fehérjék, valamint proteolitikus hasítást követően az extracelluláris térben jelenlevő szolubilis molekulák. A ligandumokat a receptorokhoz való affinitásuk alapján ma három csoportba soroljuk:

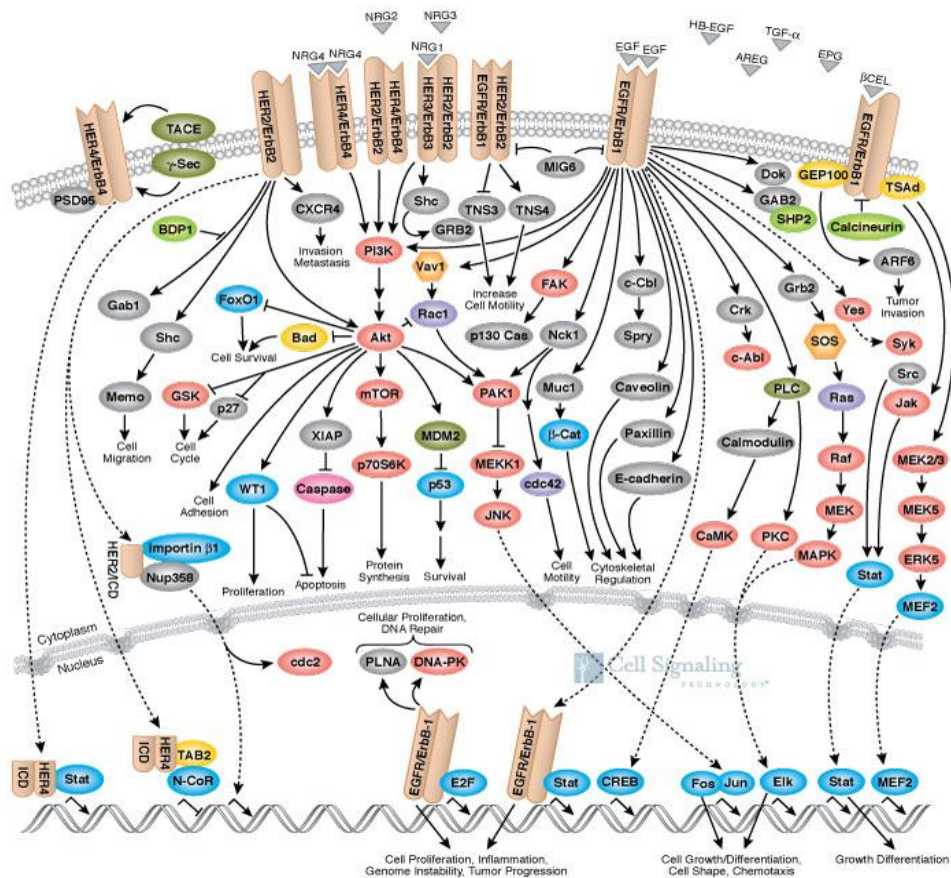
1. EGF-szerű ligandumok, amelyek főleg az ErbB1-hez kötődnek: EGF, TGF- $\alpha$  (transzformáló növekedési faktor  $\alpha$ ), AR (amfiredulin), EPG (epigén).
2. Neuregulinok (Heregulinok), melyek a neuregulin receptorokhoz (ErbB3 és ErbB4) kötődnek: NRG-1=HRG, NRG-2, NRG-3, NRG-4, ezen belül a HRG-nak és a NRG-2-nek  $\alpha$  és  $\beta$  izoformája is van.
3. Heparint kötő EGF (HB-EGF), BTC (betacellulin) és EPR (epiregulin), melyek egyaránt kötődhetnek az ErbB1-hez és az ErbB4-hez is.

Az ErbB2-nek nincs ismert fiziológiás liganduma, ugyanakkor heterokomplexet alkotva a többi ErbB receptorral képes részt venni jelátviteli folyamatokban, hasonlóan az ErbB3-hoz, melynek tirozinkináz doménje nem működőképes, így önmagában nem tud jelátviteli útvonalakat aktiválni [6]. Ugyanahhoz az ErbB receptorhoz kötődő különböző ligandumok képesek eltérő biológiai folyamatokban részt venni a ligandum affinitásától függetlenül [16].

**Epidermális növekedési faktor (EGF):** az ErbB1 (EGFR) receptor liganduma, 53 aminosavból felépülő polipeptid, melynek molekulatömege 6 kDa. Nagy affinitással kötődik a sejtfelszíni ErbB1 receptorokhoz és fokozza annak homoasszociációját. A receptor a konformációjában történő változás hatására dimerizálódik, és kiváltja a sejtek proliferációját [17].

**Heregulin (HRG, NRG-1):** az ErbB3 és az ErbB4 liganduma, 44 kDa molekulatömegű. Több izoformája is ismert, de a legtöbbet említett a HRG- $\alpha$  és HRG- $\beta$ , melyek szerkezetüket tekintve nagyon hasonlóak, de a kötődés affinitása eltérő. A HRG- $\alpha$  kötődése 2 nagyságrenddel kisebb, mint a HRG- $\beta$ -é [18]. Kísérleteim során a nagyobb affinitású HRG- $\beta$ -t használtam.

Az ErbB receptorok és ligandjaik által indukált jelátviteli útvonalakat szemlélteti az **5. ábra**.



5. ábra: Az ErbB receptor család jelátviteli modellje (Cell Signaling, (ErbB/Her))

A különböző ligandumok az ErbB fehérjék ECD-jéhez kötődnek, melynek hatására a receptorok konformációváltozást szenvednek, ami elősegíti a homo- és heterodimerizációjukat. Attól függően, hogy milyen ligandum mely receptorhoz kötődik, és azon belül is pontosan melyik tirozin foszforilálódott, eltérő jelátviteli útvonalak aktiválódnak [19]. Az EGFR esetében az elsődleges adaptor fehérje a Grb2/SOS komplex [20], amely a proto-onkogén Ras és azon keresztül a Raf-1 fehérjét aktiválja. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal számos transzkripciós faktor aktiválásán keresztül fokozza a sejtek proliferációját. Két másik fontos útvonal a foszfolipáz C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) és a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K). Az aktivált PLC- $\gamma$ , melyet kizárólag az ErbB1 aktivál az ErbB családon belül, felelős az 1,2-diacil-glicerol (DAG) és az inozitol-1,3,5-trifoszfát (IP3) másodlagos hírvivő molekulák képződéséért. Az IP3 hatására kalciumionok szabadulnak fel az intracelluláris raktárakból, melyek befolyásolják számos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens enzim működését, míg a DAG a proteinkináz C (PKC) kofaktora [21]. Elsősorban az ErbB3-at is tartalmazó heterodimerek által aktivált PI3K az Akt kináz útvonalon keresztül a sejtek túléléseért, proliferációjáért felelős, így feltehetőleg az ErbB fehérjék antiapoptotikus hatásának fő mediátora [22].

### ***2.3. Az ErbB fehérjék szerepe mellrákban, molekuláris daganatterápia***

A daganatos sejtek növekedését gyakran a fokozottan kifejezett („overexpresszált”) onkogének befolyásolják, ezért még előrehaladott daganatos betegség esetében is sikeres lehet olyan terápia alkalmazása, amellyel a fokozottan kifejeződő onkoproteint célozzák meg [23, 24]. Az ErbB2 gén amplifikációja és fokozott sejt felszíni kifejeződése figyelhető meg az emlőtumorok 20-30%-ában [1], melyeket ErbB2-pozitív emlőráknak nevezünk. Ha a beteg daganata ErbB2-pozitív, akkor betegségének rosszabb a prognózisa, mint az ErbB-negatív betegeké, nagyobb a valószínűsége az áttétképződésnek, tehát csökken a túlélés esélye [25, 26]. A klinikumban jelenleg nincs olyan monoterápia, ami önmagában elég hatásos lenne. A leggyakoribb kezelés a kemoterápia, azonban az alkalmazott citosztatikumok kivétel nélkül jelentős mellékhatásokat okoznak [27, 28]. A kemoterápiát gyakran radioterápiával is kombinálják, azonban ennek is komoly mellékhatásai vannak [29]. A hagyományos tumorterápiás eljárások mellett, amelyek aspecifikusak, egyre elterjedtebbek a molekuláris alapú kezelések. Az egyik legfontosabb célmolekula az ErbB2, mivel a dimerizáció és aktiváció gátlásával csökkenthető a daganatsejtek növekedése, tehát a receptor funkciójának blokkolásával befolyásolhatóak lehetnek a malignus folyamatok. Az ErbB2 gátlása több módon lehetséges, pl. tirozin kináz aktivitásának gátlása kináz inhibitorokkal [30], az ErbB2

fehérje termelésének gátlása anti-sense oligonukleotidokkal vagy siRNS-sel [31], mRNS-ének hasítása ribozimmal [32], ErbB2 ellenes antitestekkel (trastuzumab, pertuzumab) [33], toxinok kapcsolása az antitestekhez (immunotoxin) [34], immunizálás ErbB2 peptidekkel [35].

Tirozinkináz inhibitoroként a klinikumban is használják az EGFR ellen a gefitinibet (Iressa®) és az erlotinibet (Tarceva®), de elterjedőben van az EGFR és ErbB2 tirozinkináz aktivitását egyaránt gátló lapatinib (Tykerb®) molekula is. A kinázinhibitorok mellett receptor ellenes monoklonális antitesteket is használnak mind az EGF receptor, mind az ErbB2 ellen. Ezek egy része a ligandum kötődéssel kompetál (pl. az EGFR ellenes cetuximab, Erbitux®) vagy a receptor aktiválódását gátolja valamilyen módon, vagy az immunrendszert aktiválja (részletesen lásd a következő alfejezetben).

Az ErbB2 jelentőségét tovább fokozza, hogy nem csak az ErbB család tagjaival, de más molekulákkal is alkothat funkcionális egységet. Többek között a MUC-4 [36], CD44 receptor [37] és hialuronsav [38] olyan molekulák, amelyek kapcsolata az ErbB2-vel már dokumentált, ugyanakkor ezek a molekulák önmagukban is szerepet játszanak a tumorok fejlődésében.

## ***2.4. Antitestterápia, specifikus tirozin kináz inhibitorok***

### **2.4.1. ErbB2 ellenes monoklonális antitestek**

Trastuzumab (Herceptin®, 4D5, IgG1): A trastuzumab a 4D5 jelű, ErbB2 ellen egérben termeltetett monoklonális antitest humanizált változata. A 4D5 variábilis régióját humán IgG konstans régiójával kapcsolták össze. A Herceptint az FDA (Food and Drug Administration) engedélyezte 1998-ban az USA-ban az előrehaladt állapotú, ErbB2-t fokozottan expresszáló emlődaganatok kezelésére. II-es és III-as klinikai fázisban egyértelműen bebizonyosodott daganatellenes hatása mind monoterápia formájában, mind kemoterápiával kombinálva [39, 40].

Pertuzumab (Omnitarg®, 2C4): A pertuzumabot a 2C4 jelű egér monoklonális antitest humanizálásával állították elő. Mivel az ErbB2 II. extracelluláris doménjében a dimerizációért felelős hurokhoz kötődik, ezért sztérikusan gátolja az ErbB2 heterodimerizációját [41]. Előnye, hogy nemcsak megállítja a sejtek növekedését, hanem a tumor méretét is csökkenti, elpusztíthatja a rákos sejteket, ellentétben a trastuzumabbal. Képes arra is, hogy a rákos sejtek felszínén akár csak kis mennyiségben megjelenő ErbB2 fehérjének a család más tagjaival (pl. ErbB3) történő heterodimerizációját megakadályozza [15], és így blokkolja a Ras-MAPK jelátviteli útvonalat.

### **2.4.2. ErbB1 ellenes monoklonális antitest**

Az ErbB receptorcsalád más tagjai ellen termeltetett antitesteket is vizsgálnak, amelyek közül több klinikai kipróbálás vagy már alkalmazás alatt áll.

Cetuximab (Erbbitux®): a tumorterápiában hatékonyan alkalmazzák a cetuximabot, az EGF receptor elleni humanizált monoklonális antitestet, melyet az EGFR ECD-je ellen terveztek. Kompetitíven gátolja az EGF kötődését a receptorához [42].

### **2.4.3. ErbB1 tirozinkináz gátlók**

Az ErbB1 fokozott kifejeződése a daganatok széles spektrumában észlelhető. Kulcsfontosságú olyan sejtfunkciók szabályozásában, mint a sejtek túlélése, így ha megakadályozzuk aktivációját (anti-ErbB1 antitestekkel vagy specifikus kináz inhibitorokkal), gátolhatjuk a másodlagos jelátvivő rendszereket, ezáltal megakadályozhatjuk a sejt túlélését, a daganatok növekedését.

Gefitinib (Iressa®), Erlotinib (Tarceva®): a klinikumban is használt EGFR elleni protein kináz gátló daganatellenes gyógyszerek, melyek elősegítik a tumorok növekedésének és terjedésének lelassulását. Ezek a gyógyszerek elsősorban azokban a speciális esetekben hatásosak, amikor az ErbB1-et kifejező daganat a receptor kináz doménjében mutációt tartalmaz [43].

A molekuláris, új támadáspontú gyógyszerek előnye, hogy általában csak azon daganatokra hatnak, melyek a célmolekulát kifejezik és a célmolekula kifejeződése a daganat fennmaradásában fontos szerepet játszik. Ezen szűk hatásspektrum miatt kevés a mellékhatásuk. Azonban ugyanezen ok miatt szinte minden onkoprotein, vagy tágabb értelemben daganat keletkezésében szerepet játszó molekula ellen ki kell fejleszteni specifikus gátlószert, és meg kell tanulni, hogy ezek, ill. ezek kombinációja, mely daganatok ellen hatásosak. Ezért az új támadáspontú gyógyszerek kutatására jelenleg is nagy erőket összpontosítanak. A fejlesztésre az alábbi módszereket használják:

- (i) a molekulát tudatos eljárással tervezik meg a target fehérje háromdimenziós szerkezete alapján
- (ii) a célfehérje ellen monoklonális antitestet készítenek
- (iii) a természetből véletlenszerűen izolálnak új molekulákat, melyek daganatellenes hatását is vizsgálják. Ezen molekulák közül azok a legértékesebbek, melyek újszerű hatásmechanizmust mutatnak (pl. a National Cancer Institute „Compare” adatbázisa alapján).

A 2.5-2.9 alfejezetekben az általam részletesebben vizsgált két, molekuláris támadáspontú gyógyszerről, a trastuzumabról (ii. csoport, ErbB2 ellenes monoklonális antitest) és az elisidepsinről (iii csoport, természetből izolált anyag szintetikus származéka) írok részletesen.

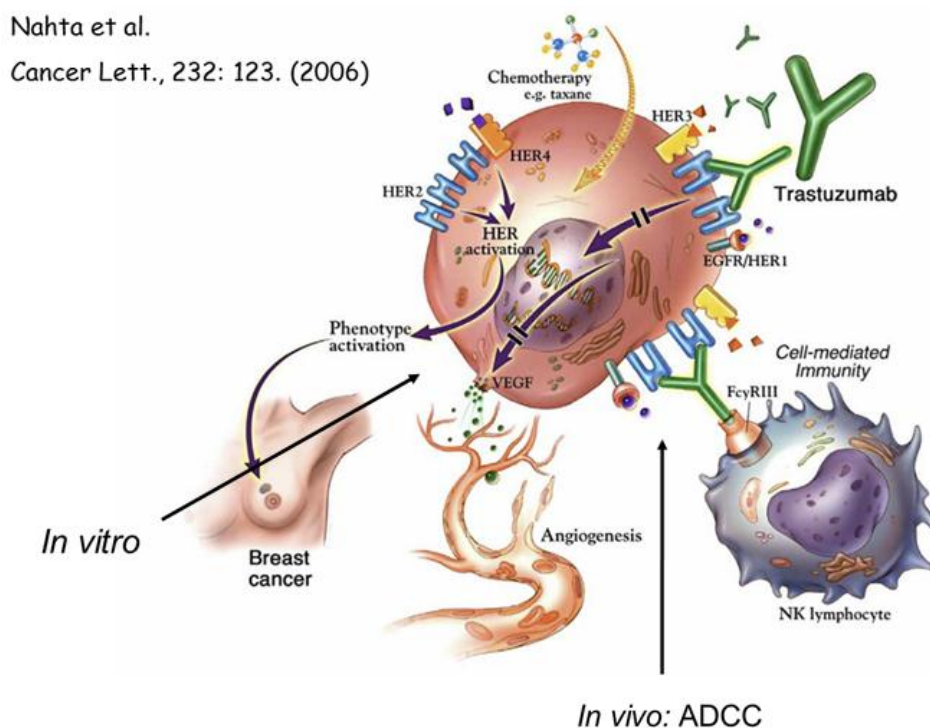
### **2.5. Trastuzumab hatásmechanizmusa**

A kedvező klinikai eredmények miatt a trastuzumab széles körben alkalmazott gyógyszer ErbB2-t fokozottan kifejező emlődaganatok kezelésében. Kezdetben előrehaladott daganatok kezelésében alkalmazták monoterápiában mint végső lehetőséget, manapság viszont más, konvencionális kemoterápiás szerrel kombinálva használják a primer tumor eltávolítását követően vagy inoperábilis daganatok esetében. A széleskörű alkalmazás ellenére hatásmechanizmusa ma sem teljesen ismert. Irodalmi adatok alapján, *in vitro* körülmények között, az alábbi mechanizmusokat feltételezik:

- az antitest közvetlen, daganatsejtekre kifejtett hatása:
  - A trastuzumab, mint bivalens antitest, keresztüköt két ErbB2 receptort és ezzel olyan jelátviteli utakat indít el, amelyek egyik eredménye az ErbB2 internalizációja és down-regulációja (a sejtfelszíni ErbB2 mennyisége csökken), valamint a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) útvonalak inaktivációja, ami végül apoptózishoz vezet [44, 45]. Másik elmélet szerint a trastuzumab aktiválja a PTEN (foszfatáz- és tenzinhomológ gén) foszfatázt, ami az Akt defoszforilációja útján megakadályozza a sejtek proliferációját [46].
  - a trastuzumab csökkenti a ciklin D1 expresszióját, ami csökkenti a p27<sup>kip1</sup> ciklin-függő kináz inhibitor szekvesztrációját és lehetővé teszi a sejtciklus G1 fázisban történő leállítását a ciklin E/cdk2 komplex gátlása által [47].
  - növeli az ErbB2 humán leukocita antigén-I-hez (HLA-I) kapcsolódó antigénprezentációjának mértékét [48].
  - a trastuzumab gátolja az ErbB2 metalloproteázok általi proteolitikus hasítását, ami egy olyan trunkált ErbB2 receptort eredményez, ami csak az intracelluláris és a transzmembrán domént tartalmazza és konstitutívan aktiválja a másodlagos jelátviteli rendszereket [49].

- indirekt hatás a tumorsejtekre, mely *in vivo* alkalmazás esetén valósulhat meg:
  - a kezelés csökkenti a kis erek számát és átmérőjét, aminek háttérben négy érképződést segítő növekedési faktor (vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF); transzformáló növekedési faktor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ); angiopoietin-1, plasminogen aktivátor inhibitor-1 (PAI-1)) expressziójának csökkenését találták és érképző gátló növekedési faktor (pl. thrombospondin-1 (TSP-1)) szintjének növekedését. Ezeket állatkísérletek során mutatták ki [50].
  - az immunrendszer által, közvetve létrejövő hatás, melynek során az emlőtumor sejtek ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) segítségével pusztulnak el. Ennek során a daganatsejt felszínéhez kötődött antitestet Fc- $\gamma$  receptorral rendelkező immunkompetens sejtek felismerik és elpusztítják. Az antitest Fc részének fontos szerepét bizonyítja, hogy (i) Fc rész mentes, bivalens F(ab)<sub>2</sub> fragmentum daganatellenes hatása gyengébb vagy elhanyagolható a teljes antitesthez képest; (ii) aktiváló Fc- $\gamma$  receptor deficiens egerekben a trastuzumab sokkal kevésbé hatékony [51, 52].

A trastuzumab lehetséges mechanizmusának sematikus szemléltetését a **6. ábra** mutatja:



6. ábra: A trastuzumab hatásmechanizmusának szemléltetése

Korábban a trastuzumab ErbB2-t down-reguláló képességét tartották leginkább felelősnek daganatgátló hatásáért, de újabb klinikai vizsgálatok alátámasztják az Fc rész mediálta ADCC fontosságát, ahol is az Fc-receptorral rendelkező immunsejtek (NK sejtek, neutrofil granulociták, monociták, makrofágok) ölik meg a daganatsejteket. A gyógyszer hatásának nagyobb részéért (~2/3) az ADCC felelős, ~1/3-ad része mögött pedig az antitestnek a daganatsejtekre közvetlenül kifejtett hatása áll.

## **2.6. Trastuzumab rezisztencia**

A kedvező klinikai eredmények ellenére sajnos néhány ErbB2-pozitív mellrák elsődlegesen rezisztens (primer rezisztencia) a trastuzumab terápiára, és az esetek nagy részében a rezisztencia egy éven belül kialakul azoknál a betegeknél is, akik kezdetben válaszoltak a terápiára (szekunder vagy szerzett rezisztencia) [40, 53]. A trastuzumab rezisztencia feltehetően multifaktoriális és az alábbi mechanizmusok egyaránt felelősek lehetnek ennek kialakulásáért:

- különböző alternatív jelátviteli útvonalak aktiválódása
  - i. EGF-szerű ligandumok autokrin termelése fokozhatja az ErbB család más tagjain keresztüli jelátvitelt [54]
  - ii. az inzulin-szerű növekedési faktor receptor útvonalának aktiválódása [55]
  - iii. Akt útvonal aktiválódása [56]
- epitóp maszkírozás:
  - i. a MUC-4 nevű sejtfelszíni szialomucin eltakarhatja az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját (maszkírozás) [36, 57]
  - ii. a trastuzumab ErbB2-höz való kötődését a tumorban felhalmozódó hialuronsav is gátolhatja [38]
- a PTEN tumorszuppresszor csökkent expressziója [46]
- elégtelen trastuzumab által kiváltott ADCC reakció; a rezisztencia kialakulása ebben az esetben trastuzumab-közvetítette ADCC-vel szembeni rezisztencia kialakulását jelenti [51]

Munkám során a rezisztencia mechanizmusok közül részletesen az ErbB2 hialuronsav általi maszkírozásával foglalkoztam, ugyanis munkacsoportunk és mások is felvetették korábban, hogy egyes molekulák (MUC-4, hialuronsav) képesek lehetnek eltakarni az ErbB2 receptort, így a trastuzumab kevésbé fér hozzá. A 2.7-2.8 alfejezetekben ennek részleteit foglalom össze.

## **2.7. A CD44 molekula szerkezete és funkciója**

A CD44 molekulát (limfocita homing receptor, PGP-1, Hermes antigén, HUTCH-1), az ErbB proteinek interakciós partnerét, elsőként mint hialuronsav receptort írták le, aminek szintén fontos szerepe van számtalan humán tumor kialakulásában és fejlődésében. Standard formája egy 80-90 kDa-os transzmembrán glikoprotein. Szerkezetét tekintve három részre osztható: ECD, transzmembrán domén és citoplazmatikus domén. Az ECD amino terminális szakasza globuláris szerkezetű, melyet három diszulfid-híd stabilizál. Ezt kötő (link) doménnek is nevezik, itt található a hialuronsav-kötő régió is. A hialuronsav kötődése a CD44-hez aktiválja a receptort és az asszociált molekulákon (pl. ErbB2) keresztül változatos jelátviteli útvonalakat indít be [37], amelyek elősegítik a migrációt és a metasztázisképzést. A hialuronsav akkumulációja egyértelműen a tumor kedvezőtlen prognózisának indikátora [58]. A fentiek alapján megalapozottnak tűnik az ErbB2-hialuronsav indirekt kölcsönhatás szerepe emlőtumorban, azonban a pontos mechanizmus nem ismert.

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a membránproteinek funkcionális szabályozásának egyik eleme az extra-, illetve intracelluláris doménjeik proteolitikus hasítása [59]. A ligandkötő rész (ektodomén) leválásáért és extracelluláris részbe történő jutásáért (shedding) többféle proteolitikus mechanizmus felelős. A shedding során képződött CD44 szolubilis intracelluláris domén transzlokálódik a magba és ott transzkripciót indít be. Ennek fontos szerepe van a tumorok metasztázisképzésében. Számtalan faktorról (pl. EGF, heregulin, kis molekulású hialuronsav) kimutatták, hogy fokozza a CD44 sheddingjét, internalizációját, valamint a CD44 intracelluláris domén nukleáris transzlokációját, és ezáltal elősegíti a tumorok migrációját, áttétképzését és a daganatos progressziót [60]. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a trastuzumab csökkenti a CD44 kis molekulású hialuronsav és a heregulin által kiváltott sheddingjét [61] és ezzel összefüggésben csökkenti a keringő daganatsejtek mennyiségét kísérleti egerekben [62]. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a hialuronsav, a CD44 és az ErbB fehérjék együtt egy jelátviteli komplex részeit képezik.

## **2.8. A hialuronsav (HA) szerepe a tumor progresszióban és az ErbB2 maszkírozásában**

A hialuronsav egy anionos poliszacharid, nagy mennyiségben megtalálható a kötő-, epithelialis és idegszövetekben. Nagy térkitöltésű molekula, az extracelluláris mátrix (ECM) egyik fő komponense. Jelentős szerepet játszik a karcinogenezisben [63]. Tumorokban

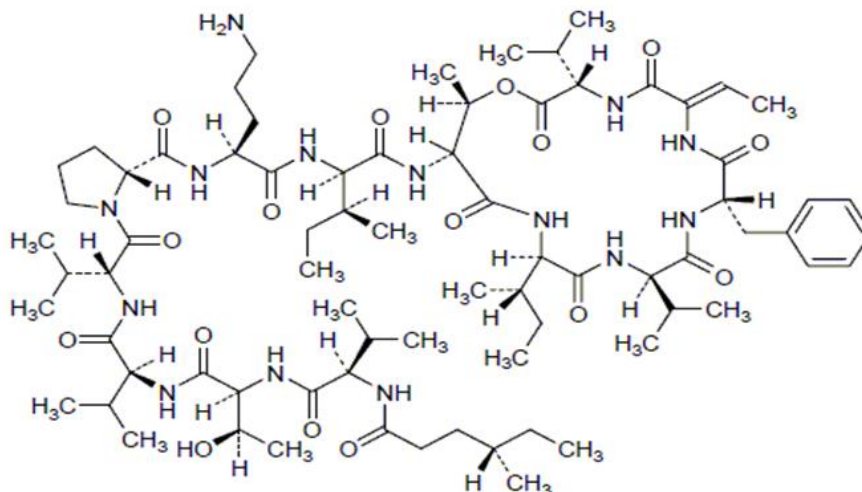
megfigyelhető a HA mennyiségének növekedése, amit a hialuron szintáz (HAS1-3) termel a malignus vagy a stróma sejtekben [64, 65]. A HA közreműködik a sejtnövekedésben és motilitásban, de még nagyobb szerepe van a proliferációban, migrációban, véredényképzésben, multidrog rezisztenciában (MDR) és az epiteliális-mezenchimális átmenetben (EMT) [63]. Az utóbbit a HA vagy annak kis molekulásúlyú degradációs termékének kötődése váltja ki elsődleges sejt felszíni receptoraihoz (CD44, RHAMM) [66]. Ezek a receptorok vagy közvetlenül stimulálják a sejt válaszokat vagy ErbB fehérjéket is magukba foglaló multiprotein komplexek részeként [61, 63]. Úgy tűnik, hogy a hialuronsav kettős szerepet játszik a malignus folyamatokban. A magas HA tartalmú adenokarcinómák (főleg nőknél) agresszíven növekednek és enyhén differenciáltak, míg laphámrákok (főként férfiaknál) esetében a csökkent HA szint társul rossz prognózissal [63]. Továbbá, a HA túlermelődése az emlőkarcinómákban meggyorsítja a tumor növekedését a stróma sejtek toborzása miatt, stimulálja a véredényképződést, ami a tumor kedvezőtlen prognózisának indikátora [58, 67, 68].

A fenti hatásakon kívül munkatársunk korábban sejt vonalon (*in vitro*) és egér xenograftokon végzett kísérletei bizonyították, hogy az ErbB2 hialuronsav által történő maszkírozása a trastuzumab kötődésének csökkenéséhez és rezisztencia kialakulásához vezethet. JIMT-1 xenograftok, amelyek kezdetben szenzitívek voltak a kezelésre, ~10 hét folyamatos kezelés során fokozatosan rezisztensé váltak trastuzumabra. A rezisztencia kialakulását valószínűleg az ErbB2 hialuronsav által történő maszkírozása okozta, hiszen a 4-metilumbelliferon (4-MU), a hialuronsav szintetáz gátlószere, szignifikánsan növelte a trastuzumab tumorsejtekhez való kötődését (*in vivo* és *in vitro*) és a trastuzumab tumorelleses hatását [38]. Elmondható, hogy a 4-MU szabaddá tette az ErbB2 trastuzumab-kötő epitópját, és ezáltal hasonló terápiás hatású molekulák a jövőben akár gyógyszerként is használhatóak lesznek.

### **2.9. Az elisidepsin molekuláris hatásmechanizmusa**

Mivel sok természetes, állati, ill. növényi eredetű anyagnak van farmakológiai és biológiai hatása, ezért ezen források olyan új hatóanyagok felfedezésének forrásai, amelyek alkalmazásával kevesebb mellékhatással ugyanolyan vagy nagyobb tumor ellenes hatás érhető el. Egy ilyen ígéretesnek bizonyuló anti-tumor anyag a Kahalalide F, amit először a Csendes-óceán (Hawaii) egyik puhatestűjéből (*Elysia rufescens*) vontak ki, ugyanis ezek egy olyan alga fajtaival (*Bryopsis pennata*) táplálkoznak, amelyek ezt a citotoxikus hatású anyagot

termelik [69]. Mivel a Kahalalide F izolálása elég nehézkesnek bizonyult, ezért ennek egy közeli rokonát szerves kémiai szintézissel kezdték előállítani [70]. Ennek a hatóanyagának a neve az elisidepsin ( $C_{77}H_{125}F_3N_{14}O_{18}$ ), kereskedelmi neve pedig az Irvalec (PM02734).



7. ábra: Az elisidepsin kémiai szerkezete

Az elisidepsin egy olyan ciklikus depsipeptid (egy vagy több amid kötést észter kötés helyettesít), ami a daganatos megbetegedések széles spektrumában bizonyult *in vitro* kísérletek alapján hatásosnak. Még a részletes farmakodinamikai tanulmányozás előtt nyilvánvalóvá vált, hogy az elisidepsin egyedi hatásmechanizmussal rendelkezik, ugyanis a National Cancer Institute (NCI) „Compare” analízise alapján tumoros sejtvonalakra kifejtett hatásspektruma különbözik minden más, korábban karakterizált vegyületétől. Ezen reményt keltő kezdeti eredmények alapján várható volt, hogy olyan daganatokra is hatásos lesz, melyek a hagyományos kemoterapikumok ellen rezisztensek. Az elisidepsin hatással van többfajta tumor típusra (mell-, vastagbél-, hasnyálmirigy-, tüdő-, prosztaták) és mivel pre-kliniai vizsgálatokban anti-tumor hatása a nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC) jelentős (erlotinibbel kombinálva), ezért bevezették a fázis II klinikai vizsgálatokba még azelőtt, hogy részletes hatásmechanizmusát feltárták volna [71].

Bár támadáspontjáról keveset tudunk, megfigyelések szerint a vegyület a lizoszomális membrán felszakadását [72], sejtmag fragmentációt [73] és nekrotikus sejthalált [73-75] indukál, melyet intenzív sejtduzzadás kísér. Azt feltételezték, hogy mind a Kahalalide F, mind az elisidepsin az Akt aktiváció gátlásával fejt ki hatását [74, 76]. Egy újabb cikk szerint az elisidepsin a tumor-sejtek plazmamembránjára hat, ahol is a lipid kettősréteg átrendeződését váltja ki [77]. FA2H-val (fatty acid 2-hydroxylase) történő transzfekeció érzékenyebbé tette a

sejteket az elisidepsin iránt, utalva arra, hogy az enzimnek, ill. az általa létrehozott 2-hidroxi zsírsavaknak szerepe van a drog hatásmechanizmusában [78]. Az FA2H-nak szerepe van a lipid tutajok stabilizációjában [79], tehát feltételezhetjük, hogy az elisidepsin membránhoz kötődése a lipid tutajokban történik.

Indirekt bizonyítékok alapján feltételezték, hogy az ErbB proteinek szerepet játszhatnak az elisidepsin hatásmechanizmusában. Janmaat és munkatársai korrelációt találtak sejtek Kahalalide F iránti szenzitivitása és ErbB3 expressziójuk között és ErbB3 transzfeciával fokozható volt a sejtek Kahalalide F iránti érzékenysége [74]. Más eredmények szerint az elisidepsin iránti szenzitivitás nemcsak az ErbB3, hanem az ErbB1-3 fehérjék expressziós szintjével áll korrelációban [76]. Bár az említett cikkekben közölt korrelációk elég gyengék voltak, a szerzők azt állították, hogy az elisidepsin hatásmechanizmusában az ErbB fehérjék fontos szerepet töltenek be.

### **2.10. Molekuláris asszociációk szerepe és azok vizsgálata**

A növekedési faktor receptorok asszociációja a szignalizációs folyamatok első lépése. A transzmembrán receptorok kisebb-nagyobb mértékű csoportosulása, illetve konformáció változása sokszor elengedhetetlen a ligandum-receptor kölcsönhatás végkimenetelének meghatározásában. Számtalan molekuláris és immunológiai vizsgálmódszer áll rendelkezésünkre a sejtfelszíni fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, azonban egyesek jelentős hátránnyal is rendelkeznek. A leggyakrabban használt módszerek az alábbiak:

#### **1. Kvalitatív-szemikvantitatív eljárások:**

- hagyományos molekuláris biológiai módszerek („*co-capping*”, *koprecipitáció*, *kémiai keresztkötés*, *Western-blot technika*): értékes információt szolgáltat a fehérjék elhelyezkedéséről, azonban az alkalmazott kivonási és izolálási eljárások eleve megakadályozzák, hogy a fehérjéket a saját környezetükben vizsgáljuk, másrészt ezek a módszerek mesterséges aggregátumok kialakulását is okozhatják [80].

**„co-capping”:** a vizsgálat során a fluoreszcens festékekkel konjugált antitesttel megjelölik a sejteket, aztán anti-IgG-vel inkubálják, majd végül megfestik egy másik fehérje ellenes, eltérő színű fluoreszcens jelzéssel ellátott antitesttel. A két fluoreszcens jel egy „sapkában” (cap) történő megjelenése a két molekula kölcsönhatására, együtt mozgására (ko-mobilitás) utal.

**koprecipitáció:** a legtöbb fehérje a sejtben más fehérjékhez kötve helyezkedik el. Ha a komplex egyik fehérjéje ellen termelt ellenanyaggal immunprecipitáljuk a fehérjét, megfelelő körülmények között a komplex többi tagja is immunprecipitálódni fog.

**kémiai keresztkötés:** A koprecipitációs technika kiegészítőjeként használják olyan esetekben, amikor a vizsgált fehérjék közötti kölcsönhatás nem eléggé stabil, és ezért a lízis során nem maradnak együtt. A kémiai keresztkötés során az élő sejtben kovalens kötést hoznak létre az egymással kölcsönható, ill. egymáshoz közel levő fehérjék között, melyek kapcsolódása így irreverzibilissé válik. [81].

**Western-blot technika:** a koprecipitációs és kémiai keresztkötésen alapuló módszerek végső lépése minden esetben a fehérjék Western-blottal történő azonosítása. A Western-blot fehérje keverékek egyes komponenseinek ellenanyag segítségével történő szelektív kimutatására alkalmas módszer. Információt nyerhetünk az ellenanyag által felismert fehérjék molekulatömegéről, egy fehérje keverékben előforduló, azonos epitóppal rendelkező komponensek számáról, relatív arányáról. Kvantitatív meghatározásra csak korlátozott mértékben alkalmas. Ennek az eljárásnak a lényege, hogy a fehérje elegyet SDS-poliakrilamid gél-elektroforézis segítségével elválasztjuk moláris tömegük alapján, majd a fehérjéket membránra (PVDF, nitrocellulóz) blottoljuk át és az átblottolt fehérjéket mutatjuk ki elsődleges, ill. másodlagos ellenanyagok hozzáadásával.

➤ élesztő két-hibrid (yeast two-hybrid, **Y2H**) és bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs (**BiFC**) technikák: általánosan használják fehérjekomplexek azonosítására és azok interakciójára, hátránya hogy a fragmentálódott fluorofórok és transzkripció faktorok rekonstruálása irreverzibilis.

**Y2H módszer:** alapelve, hogy a legtöbb eukarióta transzkripció faktor két fehérje doménből áll: DNS-kötő domén (DKD) és aktivátor domén (AD). A DKD a specifikus promóter szekvenciákhoz kötődik, míg az AD az RNS polimeráz II-t viszi a promóter részhez. A két domén csak együtt tud transzkripciót elindítani, viszont megőrzik aktivitásukat, ha más fehérjével fuzionáltatjuk őket. A transzkripció faktor két doménjét elválasztjuk egymástól, és az egyik domént egy ismert fehérjével fuzionáltatjuk („bait” vagy „csali” fehérje). A másik doménhez egy expressziós könyvtár fehérjeit fuzionáltatjuk („prey” vagy „áldozat” fehérje). Mind a csali, mind az áldozat fehérjéket tartalmazó plazmidot bejutattjuk a célsejtbe. A reporter gén transzkripciója csak akkor fog megindulni, ha a transzkripció faktor két doménjét a csali és az áldozat fehérje összekapcsolja egymással [82].

**BiFC technika:** A módszer alapelve nagyon hasonlít a Y2H technikához. Fluoreszcens fehérjét N- és C-terminális részét kódoló plazmidokat hoznak létre, és a „kettévágott” fluoreszcens jelzőfehérje N-, ill. C-terminális részeit illesztik külön-külön a vizsgálandó fehérjékhez. Ebben az esetben csak akkor jön létre fluoreszcencia, ha a vizsgálandó fehérjék kölcsönhatásának következtében a fluoreszcens fehérje két része kellő közelségbe kerül egymáshoz és összekapcsolódik [83].

Az eddig említett módszerek hátrányai közé tartozik, hogy a következő pontban felsorolt megközelítésekkel ellentétben nem adnak kvantitatív információt a fehérje kölcsönhatások mértékéről, ill. szinte minden esetben jelentős az aspecifikus kölcsönhatások kimutatásának a veszélye. Ezt a sejt lízist igénybe vevő módszerek esetében maga a lízis okozza, amely elsősorban a membránfehérjék esetében jelentős mértékben megváltoztatja a fehérje környezetét. A kémiai keresztkötés esetén nyilvánvalóan a kovalens keresztkötő ágens hozhat létre olyan kapcsolatokat, amelyek a sejtben nem léteznek. A Y2H és BiFC technikák esetén pedig felmerül annak a lehetősége, hogy a kölcsönhatást nem a „csali” és az „áldozat” fehérje hozza létre, hanem a transzkripciós faktor két alegysége vagy a fluoreszcens fehérje N- és C-terminális doménje.

A fenti hátrányok ellenére a Y2H és a hozzá hasonló eljárásokat nagy áteresztőképességű vizsgálatokban (high throughput screening, **HTS**) is alkalmazzák, melyek a korai fázisú gyógyszerkutatás meghatározó módszerévé váltak. Ugyanis nyilvánvalóvá vált, hogy a jelátviteli folyamatok megértése, ill. lehetséges gyógyszer-támadáspontok azonosítása szempontjából elengedhetetlen a fehérjék interakciós mintázatának („interactome”) feltárása. A HTS módszer során kiválasztott célfehérje kiindulási pontja lehet egy esetleges gyógyszer kifejlesztésének [84]. Tehát ezek a módszerek csak meggyorsíthatják a vezérmolekulák kiválasztását, de további vizsgálatok szükségesek a molekul szerkezet feltárására.

## 2. Kvantitatív módszerek:

- mikroszkópos kolokalizációs mérések: két molekula kolokalizációja azt jelenti, hogy preferenciálisan ugyanazokban a pixelekben fordulnak elő a mikroszkópos képen. Ezt általában a két fluoreszcencia intenzitás közötti korreláció elemzésével bizonyítják. A kolokalizáció kimutatása nem bizonyít molekuláris kölcsönhatást, csak azt, hogy a két fehérje a mikroszkóp feloldási szintje által meghatározott távolságon belül helyezkedik el egymástól. Ezt okozhatja közvetlen molekuláris kölcsönhatás, de ugyanazon lipid mikrodoménbe történő preferenciális beépülés is.

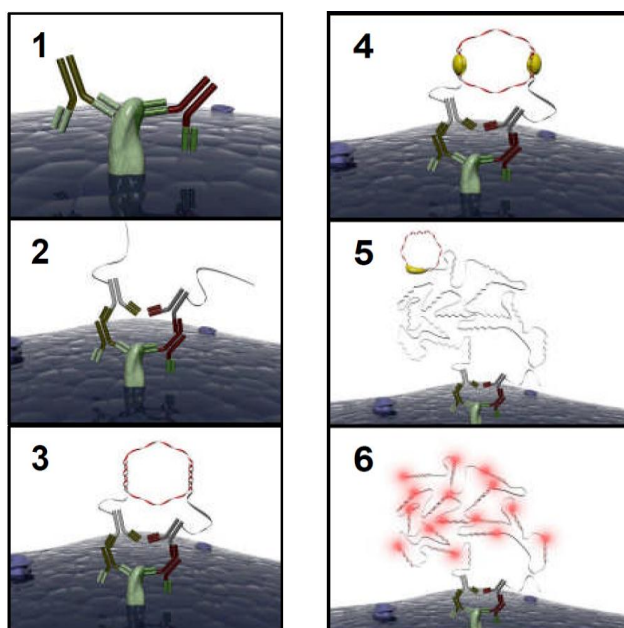
- FRET módszer: a FRET egy fluoreszcens donor és egy akceptor molekula közötti dipól-dipól kölcsönhatás révén létrejövő energiaátadás, amely hatékony intra- és intermolekuláris, nanométer léptékű távolságok (molekuláris konformáció-változások, molekuláris interakciók) vizsgálatában. Homo-FRET változatának mérésével a receptor asszociátumok méretét is meg lehet határozni [7]. A fluoreszcens jelölési módszerek (pl. fluoreszcens antitest, fluoreszcens fehérjék) „sejt-barát” tulajdonsága miatt kiváló olyan szempontból, hogy élő sejteken alkalmazható anélkül, hogy a sejtek fiziológias állapotába jelentősen beleavatkoznánk. A módszer lényegét lásd a 4.7.-es pontban.
  
- FCS módszer: kis térfogatban lejátszódó reakciók egyensúlyának és kinetikájának, molekulák diffúziójának, fotofizikai folyamatoknak, illetve több molekula együttes mozgásának vizsgálatára kifejlesztett technika. Konfokális mikroszkópiával való párosítása tette alkalmassá az FCS-t biológiai rendszerek tanulmányozására [85, 86], így fehérje–DNS, antigén–antitest, ligandum–receptor kölcsönhatások és nukleinsavak hibridizációja is tanulmányozható ezzel a technikával, de csak akkor használható helyesen, ha sikerül a minta koncentrációját és térfogatát úgy lecsökkenteni, hogy csak néhány molekulát detektálhassunk. A módszer fehérje asszociációk mérésére történő alkalmazásának alapja az, hogy a konfokális detekciós térfogatban a fluoreszcencia fluktuációját mérjük. Mivel a detektálási térfogat olyan kicsi (~ femtoliteres térfogat), hogy néhány molekulát tartalmaz átlagosan, a fluoreszcencia fluktuációk amplitúdója a diffúziós egységek nagyságával arányos: tehát dimer esetében kétszer akkora, mint monomer esetében. Ez a módszer a sejtek molekuláris szintű kölcsönhatásainak a szinte egyetlen vagy legalábbis néhány molekulára leszűkíthető vizsgálatát teszi lehetővé. Ilyen feloldású vizsgálatok *in vivo* rendszerekben eddig nem léteztek. A módszert már ma is széleskörűen alkalmazzák a gyógyszeriparban.

A fehérje asszociáció vizsgálatára használt módszereket kvantitatívitásuk mellett az alapján is osztályozhatjuk, hogy egymástól milyen távol levő molekulák közötti interakciót képesek detektálni. A FRET, az élesztő két-hibrid, a fluoreszcencia komplementáció közvetlen molekuláris kölcsönhatásokat mutat ki. A fluoreszcens mikroszkópos eljárások (kolokalizáció, FCS) annyit árulnak el, hogy a vizsgált molekulák a mikroszkóp feloldóképessége (~200 nm) által meghatározott távolságon belül helyezkednek el. A koprecipitáció és kémiai keresztkötés eljárások pontos feloldóképessége nehezen definiálható

amiatt, hogy a módszer jelentős perturbációt okoz a vizsgált molekulákban, ill. környezetükben, de valószínűleg a molekuláris és mikroszkópos módszerek között helyezkedik el.

A proximitás ligációs vizsát (proximity ligation assay, PLA) egy újabb technika, melynek teljesítőképességét kvantitatív szempontból még nem vizsgálták. A módszer képes protein interakciók (pl. protein dimerizáció) vagy modifikációk (pl. protein foszforiláció) detektálására és egyedisége abban mutatkozik meg, hogy módosítatlan, friss sejteken és fagyasztott metszeteken is alkalmazható a többi módszerrel ellentétben. A módszer molekuláris interakciók detektálására használt változata azon alapszik, hogy a két vizsgált molekulát olyan antitestekkel jelölik meg, melyekhez DNS oligonukleotidokat kötöttek. A két antitesthez kötött oligonukleotidok ún. összekötő („connector”) oligonukleotidok segítségével hibridizálnak egymással (ha molekuláris közelségben vannak egymáshoz), és egy cirkuláris DNS molekula jön létre, amit RCA („rolling circle amplification”) reakcióval felerősítenek. A képződött amplifikált terméket fluoreszcens oligonukleotid hibridizációjával teszik láthatóvá [87]. Az *in situ* PLA módszer lépéseit a **8. ábrán** követhetjük végig:

1. Blokkolás és elsődleges antitestek kötődése
2. PLA próba kötődése
3. Hibridizáció
4. Ligáció
5. Amplifikáció
6. Detektálás



**8. ábra:** A PLA kísérlet folyamatának lépései (Duolink Kit használati útmutató, Olink Bioscience)

1. Ugyanazon molekula vagy komplex két különböző epitópjához két különböző típusú elsődleges antitest kötődik.
2. Két PLA próbát, vagyis oligonukleotidokkal konjugált, egymással nem kompetáló másodlagos antitestet kötnek a primer antitestekhez. Ha az oligonukleotidok az elsődleges

antitestekhez vannak kötve, akkor ez a lépés nem szükséges. Az egyiket „priming”, a másikat „non-priming” oligonukleotidnak nevezzük. A „non-priming” oligonukleotid „csak” a PLA próbát köti a 3. pontban leírt cirkuláris DNS-hez, míg a „priming” oligonukleotid az 5-ös pontban leírt RCA reakcióban primerként viselkedik.

3. A megfelelő közelségbe kerülő oligonukleotidok és az összekötő oligonukleotidok egy cirkuláris DNS molekulát képeznek.

4. A cirkuláris DNS molekulát DNS ligáz hozzáadásával folytonossá teszik.

5. DNS polimeráz és nukleotidok hozzáadása után az újonnan formálódott cirkuláris DNS molekula RCA reakció által amplifikálódik. Az RCA reakció során a „priming” oligonukleotid hosszabbodik meg azáltal, hogy a cirkuláris DNS molekula szekvenciája több kópiában hozzámásolódik.

6. A keletkezett egyszálú DNS molekula fluoreszcensen jelzett komplementer oligonukleotiddal detektálható.

A minták jelét fluoreszcens mikroszkóppal lehet vizsgálni. A PLA előnyei közé tartozik, hogy optimális körülmények között extrém kis fehérje-koncentrációk és a fehérje asszociációk kis mennyisége is kimutatható, a molekulák orientációja nem befolyásolja a folyamatot és alacsony a háttér [88, 89]. Hátránya viszont, hogy a sok inkubációs lépés miatt időigényes, és ugyanezen oknál fogva jelentős sejtvészteség léphet fel a jelölési protokoll során.

### ***2.11. Lipid tutajok szerkezete, biológiai funkciói***

A plazmamembránt amfipatikus lipid molekulák kettős rétege alkotja, melybe fehérjemolekulák süllyednek bele [90]. A Singer-Nicolson modell alapján a sejtmembránt alapvetően homogén rendszernek tételezték fel [91]. Az utóbbi évek kutatásai alapján azonban nyilvánvalóvá vált, hogy a sejtmembránban olyan mikrodomének találhatók, amelyek struktúrája, lipid- és fehérjeösszetétele eltér a környezetétől [92]. Bár feltételezhető, hogy többféle ilyen mikrodomén létezik, a legismertebb ezek közül a lipid tutaj (raft). [93]. A lipid tutajokat többféleképpen szokták definiálni:

- A vizsgálatok szerint a lipid tutajok több fizikokémiai tulajdonsága eltér a környező membránra jellemző paraméterektől. Így sűrűségük alacsonyabb, hideg nemionos detergensben oldhatatlanok [94]. Ezen tulajdonságaikat összefüggésbe hozták a lipidek magas fokú lokális rendezettségével, az ennek megfelelően kialakuló folyadék-**rendezett** („liquid ordered”) fázissal, szemben a plazmamembrán többi részére jellemző folyadék-**rendezetlen** („liquid disordered”) állapottal. Továbbá a

lipid tutajok telített lipidekben, koleszterinben, szfingolipidekben és proteinekben gazdagok, mely tulajdonságok szintén hozzájárulhatnak detergens rezisztenciájukhoz. A lipidek zsírsav komponensének telített jellege miatt erős lipid-lipid kölcsönhatások alakulnak ki a lipid tutajokban.

- A fenti biokémiai definíció alapvető problémája, hogy a detergens rezisztencia és a sűrűség meghatározásához a membránt fel kell oldani, így a kapott eredmények intakt membránban található viszonyokkal való összevetése nehézkes. A lipid tutajokban található lipid és fehérje komponensek fluoreszcens jelzését követően lehetséges a lipid tutajok közvetlen megfigyelése különböző mikroszkópos és spektroszkópos technikákkal. Így megállapították, hogy a plazmamembránban léteznek olyan, 20-200 nm átmérőjű dinamikus struktúrák, melyek nagy valószínűséggel megfelelnek az előző pontban biokémiailag definiált lipid tutajoknak [95].

Egy-egy adott sejtben egyszerre számos (kialakuló, leépülő, fuzionáló) lipid raft létezik minőségileg és mennyiségileg eltérő protein és lipid tartalommal. A koleszterin kulcsszerepet játszik a raftok szerkezetének kialakulásában és funkciójában. A koleszterin membránra gyakorolt hatása függ a koleszterin lokális koncentrációjától, a körülötte lévő lipidek és proteinek mennyiségétől és minőségétől. A koleszterin telítetlen zsírsavak esetén csökkenti, míg telített zsírsavak esetén növeli a membrán fluiditását. A fluiditásnak alapvető szerepe van a membránfolyamatokban [96].

A lipid tutajok a membránstruktúrát vizsgáló kutatókon kívül a transzmembrán jelátvitel iránt érdeklődők számára is fontosak, hiszen számtalan transzmembrán és perifériás membránfehérjéről, receptorról kimutatták, hogy preferenciálisan lipid tutajokban található. Ezen fehérjék funkcióját a lipid tutajok jelenléte, összetételének esetleges megváltozása is befolyásolja. Pl. az EGF receptorcsaládba tartozó ErbB2 fehérje a lipid tutajokban található és ennek asszociációját a lipid tutajok befolyásolják [97]. A lipid raftok - a receptor aktiválása során - képesek megnövelni a különböző molekulák lokális koncentrációját és elősegíteni a jelátvitel szempontjából fontos molekuláris kölcsönhatások kialakulását. A lipid tutajoknak a szignáltranszdukciós folyamatokon kívül fontos szerepük van a excitózisban/endocitózisban, apoptózisban, a koleszterin és glükóz felvétel szabályozásban és a membrán proteinek szelekciójában és szállításában.

A lipid tutajban található membránfehérjék egy speciális osztályát alkotják a glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI-) horgonyzott fehérjék. Ezek a fehérjék a membrán külső lipid rétegéhez kapcsolódnak [98]. A GPI-horgonyzott fehérjék mobilitás szempontjából a

lipidekhez hasonlítanak, ugyanis a membránba nem egy transzmembrán fehérje szegmens segítségével, hanem egy lipid molekula által ágyazódnak. A GPI oldallánc kapcsolódása fehérjékhez az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenében történik a következőképpen: a szintézis befejezése után bizonyos fehérjék C-terminális része enzimatikusan leszakad a fehérje többi részétől és egy előre megszintetizálódott GPI molekulához kapcsolódik ugyanezen enzim segítségével.

### 3. Célkitűzések

Egyetemi doktori munkám során az ErbB receptor orientált daganatellenes terápia molekuláris vizsgálatával, ill. az ilyen jellegű kísérletek során gyakran alkalmazott fehérje asszociációs mérések két típusának, a FRET és a PLA módszer összehasonlításával foglalkoztam. A kísérletek első fázisában az irodalmi adatok alapján az ErbB fehérjékre ható, klinikai vizsgálatokban már alkalmazott elisidepsin nevű hatóanyag hatását vizsgáltuk emlőkarcinóma sejtvonalakon. Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- mennyire függ az ErbB expressziótól a különböző sejtvonalak elisidepsin iránti érzékenysége
- befolyásolja-e az elisidepsin az ErbB ellenes antitestek kötődését, valamint az ErbB fehérjék sejten belüli eloszlását és asszociációját
- a drog indukál-e membrán-változásokat, különös tekintettel a lipid tutajokban esetleg detektálható változásokra.

Munkám második fázisában az ErbB2-t fokozottan expresszáló emlődaganatok kezelésében széleskörűen alkalmazott trastuzumab antitest ellen kialakuló rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusának manifesztációját vizsgáltam humán emlőtumor mintákon. A munkacsoport korábbi, *in vitro* és állatkísérletes, eredményei alapján a trastuzumab rezisztencia egyik lehetséges oka az ErbB2 hialuronsav által történő maszkírozása, mivel a hialuronsav szintetáz gátlószere szignifikánsan növelte a trastuzumab tumorsejtekhez való kötődését és a trastuzumab tumorellenes hatását. Mivel ezt a jelenséget emberi tumormintákon még nem írták le, ezért kísérleteinkben az alábbi kérdésre kerestük a választ:

- milyen összefüggés van humán emlőtumor mintákon a hialuronsav mennyisége és trastuzumab kötődés között.

A fehérjék klaszterbe rendeződése kulcsfontosságú a jelátviteli folyamatokban. Sok módszer van a protein kölcsönhatások vizsgálatára. Egyesek közülük csak kvalitatív jellegűek, míg mások kvantitatívak és szolid fizikai elveken alapulnak (pl. FRET, FCS), de csak olyan körülmények között alkalmazhatók, amikor a háttér fluoreszcencia elhanyagolható. Ezért van szükség újabb technikákra, amelyek használhatók nehéz kísérleti körülmények között is (pl. metszetek). Ilyen nemrég leírt megközelítés a proximitás ligációs vizsgálat (PLA), aminek kvantitatív szempontból történő elemzését még nem végezték el. Ezért célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy

- a PLA jel intenzitása arányos-e a protein asszociációjával, ill. expressziós szintjével
- a FRET és PLA hasonló eredményeket ad-e ugyanazon biológiai rendszerek esetében.

## **4. Anyagok és módszerek**

### ***4.1. A kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak és plazmidok***

Kísérleteinket SKBR-3 (trastuzumab-szenzitív emlőtumor), MCF-7 (humán mellrák), CHO (kínai hörcsög ovarium) és A431 (epidermoid karcinóma) sejtvonalakon végeztük, melyek az ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) gyűjteményéből származnak, és specifikációjuknak megfelelően tenyésztettük őket korai konfluens állapotig 37C°-on 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, 10% FBS-t, 2 mM L-glutamint és antibiotikumokat tartalmazó médiumban. Az áramlási citometriás kísérletekhez a sejteket 0.05% tripszin és 0.02% EDTA-t tartalmazó PBS oldattal távolítottuk el a flaskából. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket Lab-Tech™ II (Nalge Nunc International, Rochester, NY) vagy  $\mu$ -Slide ibiTreat (Ibidi, Martinsried, Germany) 8 lyukú, fedőlemez aljú kamrában növesztettük kb. 80%-os konfluencia eléréséig.

Az ErbB2-vel stabilan transzfektált CHO (CHO-ErbB2) valamint az ErbB2-vel és ErbB3-mal transzfektált CHO (CHO-ErbB2-3) sejtvonalakat az intézetben állította elő Juhász Judit, Roszik János és Duarte Lisboa a következő protokoll szerint. A transzfekecióhoz Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) reagenst alkalmaztak. A CHO sejtekbe transzfektált ErbB2-pcDNA3 plazmidot Yosef Yarden-től (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael) kapták. A transzfektált sejteket 1 mg/ml G418-al szelektálták, majd trastuzumab jelöléssel áramlási citometriás szeparálás segítségével izolálták az ErbB2-t kifejező sejteket. Ezekbe a sejtekbe transzfektálták az ErbB3-pcDNA6-ot, amit az YFPN1-ErbB3 plazmidból állítottak elő, mely Tózsér Józseftől (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) származott. Először az ErbB3 szekvenciát amplifikálták PCR segítségével az YFP-ErbB3 plazmidból. A két PCR primer KpnI és a NotI restrikciós helyeket tartalmazott. Az amplifikált ErbB3 szekvenciát a KpnI és NotI restrikciós enzimekkel linearizált pcDNA6 plazmidba (Invitrogen) ligálták. Az ErbB3-pcDNA6-tal stabilan transzfektált sejteket 30  $\mu$ g/ml blasticidinnel szelektálták és további áramlási citométeres szortírozással választották ki azokat a sejteket, amelyek H3.90.6-tal (ErbB3 ellenes antitest) pozitív jelölődést mutattak. A CHO-ErbB2-3 sejtek  $\sim 2 \times 10^5$  ErbB2 és  $\sim 10^5$  ErbB3-fehérjét expresszálnak, amit Qifikit (Dako, Glostrup, Dánia) segítségével határoztak meg áramlási citometriával. A transzfektálatlan CHO sejtek nem fejeznek ki ErbB1-et vagy ErbB3-at, de egy nagyon alacsony endogén ErbB2 expresszió mutatkozik, ami sem áramlási citometriával, sem Western-blottal nem detektálható, csak reverz transzkripció PCR-rel [99, 100].

Az A431-erbB1-eGFP, A431-erbB2-mYFP és az A431-erbB3-citrine sejtvonalak stabilan expresszálják az ErbB1-eGFP-t (eGFP-hez fuzionált ErbB1), az ErbB2-mYFP-t (monomer YFP-hez fuzionált ErbB2) és az ErbB3-citrine-t. Ezeket a sejtvonalatokat, melyek előállítását korábban leírták [101], Donna Arndt-Jovin-tól kaptuk (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Németország). A kísérleteinkben használt sejtvonalak ErbB expresszióját az alábbi táblázat foglalja össze (**I. táblázat**):

<i>Sejtvonalak</i>	<i>Fehérje szám/sejt (<math>\times 10^3</math>)</i>		
	<i>ErbB1</i>	<i>ErbB2</i>	<i>ErbB3</i>
CHO	0	~0	0
CHO-ErbB2	0	200	0
CHO-ErbB2-ErbB3	0	200	100
A431	2000	20	3
A431 erbB1	3100	20	1.5
A431 erbB2	1200	950	1.5
A431 erbB3	2000	20	800
SKBR-3	50	800	15

**I. táblázat:** A kísérletekben használt sejtvonalak ErbB expressziós profilja.

Az ErbB proteinek kifejeződésének szintjét áramlási citometriával Qifikit segítségével határoztuk meg.

#### **4.2. RNS interferencia**

A sejteket validált “MISSION shRNA” plazmiddal transzfektáltuk, melyekről a sejtek ErbB3 ellenes shRNS-t állítottak elő (TRCN0000009835, NM\_001982.x-4705s1c1; szekvencia: CCGGAGGTTAGGAGTAGATATTGACTCGAGTCAATATCTACTCCTAA CCTCTTTTTG; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A transzfekciót a Lonza (Cologne, Németország) Nucleofector berendezésével hajtottuk végre, T oldatot és X-001 programot használva az A431 sejtek esetében, valamint C oldatot és E-009 programot az SKBR-3 sejteknél. A transzfekciót követően a sejteket 96-lyukú edénybe tettük ki és a további vizsgálatokat (elisodepsin kezelés) 60 órával később kezdtük, hogy a kifejeződő shRNS által kialakított RNS interferencia miatt az ErbB3 expressziós szintje jelentősen csökkenjen.

### **4.3. Alkalmazott antitestek és vegyületek**

Kísérleteinkben az alábbi ErbB1 ellenes antitesteket használtuk: a klinikumban is használt Cetuximab-ot a Merck-től (Darmstadt, Németország) vásároltuk; az mAb 528 monoklonális antitestet (Mab528) a HB-8509 hibridóma sejt termeli, amit az ATCC-től szereztünk be; az EGFR455 monoklonális antitestet a „455” hibridóma sejtvonal termeli, amit a European Collection of Cell Cultures-től (Wiltshire, UK) vásároltuk.

Az ErbB2 ellenes trastuzumab (Herceptin®, IgG1) antitestet a Roche Magyarország Kft-től vettük. A trastuzumab a klinikumban is alkalmazott terápiás monoklonális antitest, mely az egér 4D5 antitest humanizált változata. A pertuzumab (Omnitarg®, 2C4) és a 7C2 monoklonális antitestek a Genentech Inc. (South San Francisco, CA) ajándékai voltak. A hibridóma sejtvonalak által termelt antitesteket protein affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az ErbB3 ellenes egér monoklonális antitesteket (H3.90.6, H3.90.12 és H3.105.5) a LabVision/Thermo Fisher Scientific-től (Fremont, CA) szereztük be. PLAP (placental alkaline phosphatase) elleni monoklonális antitestet (A2951) a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO) vásároltuk.

Az elsődleges antitesteket AlexaFluor488, AlexaFluor546 és AlexaFluor647 (Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR) fluoreszcens festékekkel konjugáltuk a gyártó útmutatása szerint. Alexa647 festékkel konjugált GAMIG F(ab')<sub>2</sub>-t (goat anti-mouse immunoglobulin G) a Molecular Probes/Invitrogen-től vásároltuk meg.

Az EGF-et és a heregulin-β1 fehérjét az R&D Systems-től (Minneapolis, MN), míg a TMA-DPH-t és a Laurdan-t a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO) szereztük be. A TMA-DPH indikátort tetrahidrofuránban, míg a Laurdant DMSO-ban oldottuk fel. Az elisidepsin (PM02734, Irvalec®) elnevezésű depsizeptid a PharmaMar (Madrid, Spanyolország) gyógyszergyár terméke és DMSO-ban oldottuk fel 1 mg/ml-es koncentrációban.

### **4.4. Western blot analízis**

A sejteket PBS-sel (pH=7.4) mostuk, majd ezt követte a lízálás proteáz és foszfatáz inhibitor koktéllal (Roche) kiegészített Ripa puffer (50 mM Tris-HCl; 1% NP-40; 0,25% Na-deoxycholate; 1 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 μg/ml Aprotinin; 1 μg/ml Leupeptin; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM EDTA) felhasználásával. A fehérje extraktumot molekulatömeg alapján SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét, majd PVDF membránra blottoltuk. Az ErbB2 és ErbB3 receptorok expressziójának detektálása mAb#2248, illetve mAb#4754 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) antitestek felhasználásával történt.

#### 4.5. Életképesség vizsgálatok

Az elisidepsin rövidtávú citotoxikus hatását mikrofluorimetriás propidium-jodid (továbbiakban: PI) felvétellel vizsgáltuk. A sejteket nagy sűrűségben fekete falú, lapos aljú, 96-lyukú sejttenyésztő edénybe tettük ki és a teljes konfluencia eléréséig hagytuk őket növekedni. Majd 25 mM Hepes-t (pH 7.4), 50 µg/ml PI-t és különböző koncentrációjú elisidepsint tartalmazó friss tápfolyadékot adtunk hozzájuk. A kontroll mintához elisidepsinmentes médium került. A minták négyszerezve voltak a pontosabb mérés érdekében. A fluoreszcencia intenzitást Victor3 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA) plate olvasóval detektáltuk 37°C-on, 531 nm-es gerjesztési és 632 nm-es emissziós hullámhosszon.

A drog hosszútávú hatását az életképességre a sejtek mitokondriális dehidrogenáz aktivitásának mérésével határoztuk meg ELISA reader segítségével. Egy vízben oldódó tetrazolium-só (WST-1 reagens: 4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol diszulfonát, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) a mitokondriumok aktivitásával arányos mértékű színváltozást mutat. A reakció csak az életképes sejtekben zajlik, így a mért abszorbancia az élő sejtek mennyiségével korrelál. A sejteket (~7×10<sup>3</sup> darab) 96-lyukú sejttenyésztő edénybe tettük ki 24 órával a kísérlet megkezdése előtt. A kezelés elisidepsint különböző koncentrációban tartalmazó oldatokkal történt 2 órán át, majd mosás után még 3 napig hagytuk őket növekedni sejttenyésztő médiumban 37°C-on CO<sub>2</sub> inkubátorban. A különböző minták triplikálva voltak. A WST-1 reagens abszorbanciáját 450 és 620 nm-en mértük, majd a relatív sejtszámot az alábbi formula segítségével számítottuk ki:

$$RS = \frac{A_{450} - A_{620}}{A_{450}^{ref} - A_{620}^{ref}}, \quad (1)$$

ahol az  $A_{450}$  és az  $A_{620}$  a 450 és 620 nm-en mért minták abszorbancia értékei, míg az  $A_{450}^{ref}$  és az  $A_{620}^{ref}$  az azonos sejtszámú, kontroll mintákra jellemző abszorbancia.

Az IC<sub>50</sub> (félhatásos gátló koncentráció: az a koncentráció, ahol a sejtek 50%-a elpusztult) értékek meghatározásához a mérési pontokra az alábbi képletet illesztettük:

$$A_{min} + \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + 10^{n(\log(c) - \log(IC_{50}))}}, \quad (2)$$

ahol  $A_{min}$  és  $A_{max}$  a legkisebb, illetve a legnagyobb abszorbancia érték,  $n$  a Hill koefficiens,  $c$  az elisidepsin koncentrációja és a  $\log$  pedig a tízes alapú logaritmus.

#### 4.6. Életképesség vizsgálatok statisztikai elemzése

Egyszempontos variancia analízist (ANOVA, one-way **analysis of variance**) használtunk a különböző sejtvonalakon mért IC<sub>50</sub> értékek és a PI fluoreszcencia intenzitások (30 és 60 perceknél) összehasonlítására. A dózis-hatás görbék illesztését SigmaStat (Systat., San Jose, CA) programmal végeztük.

#### 4.7. Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérések

A FRET méréseket FacsArray áramlási citométeren (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) végeztük. AlexaFluor546-tal és AlexaFluor647-tal jelölt antitesteket használtunk donorként, ill. akzeptorként. A donor, FRET és akceptor fluoreszcencia intenzitását rendre a Yellow, FarRed és a Red csatornában mértük. A Yellow és FarRed intenzitásokat 532 nm-en gerjesztettük szilárd fázisú lézer segítségével és egy 585/42 nm-es sávszűrőn (bandpass, BP), ill. egy 685 nm-es felüláteresztő szűrőn (longpass, LP) keresztül detektáltuk. A Red intenzitás gerjesztése 635 nm-en történt dióda lézer alkalmazásával és a fluoreszcenciát 661/16 nm-es sávszűrőn mértük. A citométeren használt lézer hullámhosszakát, detektorokat és detektálási szűrőket a jobb átláthatóság kedvéért táblázatban is feltüntettem (**II. táblázat**):

<b>FACSArray</b>	<b>lézer</b>	532	532	635
	<b>detektor</b>	Yellow	FarRed	Red
	<b>szűrő</b>	585/42	685LP	661/16BP

**II. táblázat: A vizsgálatban használt FACSArray áramlási citométer optikai adatai**

A lézereknél a gerjesztés hullámhosszát, a detektornál a gyári elnevezést, a szűrőknél pedig a szűrők áteresztési hullámhossz-tartományát (pl. 585/42: 564-606 nm között; 685LP: 685 nm felett; stb.) jelöltem.

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

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

A FRET-et azért használják kiterjedten a biológiában, mert segítségével a donor és akceptor közötti távolság mérhető, ill. a donor-akceptor távolság megváltozása becsülhető. Ennek alapja az, hogy a FRET sebességi állandó ( $k_{FRET}$ ) a donor és akceptor közötti távolság hatodik hatványával fordítottan arányos:

$$k_{FRET} = konst \cdot J \cdot n^{-4} \cdot k_f \cdot R^{-6} \cdot \kappa^2, \quad (3)$$

ahol  $J$  a donor emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumainak átfedési integrálja,  $n$  a közeg törésmutatója (ezt 1,4-nek feltételezik sejtfelszíni jelölés esetén),  $k_f$  a donor fluoreszcencia átmenet sebességi állandója,  $R$  a két molekula távolsága és a  $\kappa^2$  a donor és az akceptor relatív orientációját leíró faktor. A FRET sebességét befolyásoló paraméterek közül általában csak a donor és az akceptor közötti távolság ( $R$ ) és a relatív orientáció ( $\kappa^2$ ) jön számításba. Legtöbbször a két vizsgált molekula relatív orientációja nem ismert, de a molekulák gyors forgása miatt a lehetséges irányok kiátlagolódnak és a  $\kappa^2$  értékét 2/3-nak tekintjük [102, 103]. Így feltételezhetjük, hogy a FRET sebességi állandója csak a két molekula átlagos távolságának függvénye.

A FRET hatásfokot ( $E$ ), ami megadja azon gerjesztett donor molekulák arányát, melyek FRET segítségével relaxálódnak, többféleképpen ki lehet számolni, azonban leggyakrabban a kritikus Förster távolság felhasználásával szokták kifejezni:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}, \quad (4)$$

ahol az  $R_0$  az a távolság, amelynél az adott donor-akceptor pár esetében a FRET hatásfoka 50% [104].

A FRET hatékonyságot sejtenként értékeltük ki a ReFlex szoftvert alkalmazva ([www.freewebs.com/cytoflex](http://www.freewebs.com/cytoflex)) [105]. A mérés során detektáljuk a minták intenzitás-értékeit a donor (Yellow, az egyenletekben  $I_1$ ), FRET (FarRed, az egyenletekben  $I_2$ ) és az akceptor (Red, az egyenletekben  $I_3$ ) csatornában. Minden fluoreszcencia intenzitás értéket a jelöletlen sejtek intenzitásával háttér-korrigálunk. Ezen paraméterek ismeretében a donorral és akceptorral jelölt minta mért intenzitásai a három csatornában a következők lesznek:

$$\begin{aligned} I_1 &= I_D(1-E) + I_A S_4 + \frac{S_4}{S_2} I_D E \alpha \\ I_2 &= I_D(1-E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \\ I_3 &= I_D(1-E) S_3 + I_A + \frac{S_3}{S_1} I_D E \alpha \end{aligned} \quad (5)$$

A fenti egyenletekben az  $I_D$  és  $I_A$  változók a kioltatlan donor intenzitást és a közvetlenül gerjesztett akceptor intenzitást jelölik. Az  $S_{1-4}$  faktorok a donor és az akceptor más fluoreszcens csatornákkal mutatott spektrális átfedését jellemzik. Az  $S_1$  és  $S_3$  a donor

fluoreszcencia FRET, ill. akceptor csatornába, az  $S_2$  és  $S_4$  pedig az akceptor FRET, ill. donor csatornába történő átvilágítását jellemzik. Az  $S_1$  és  $S_3$  faktorokat csak donorral, míg az  $S_2$  és  $S_4$  faktorokat csak akceptorral jelölt mintákon határozzuk meg az alábbi egyenletek szerint:

$$\begin{aligned} S_1 &= \frac{I_2}{I_1}; S_3 = \frac{I_3}{I_1}; \\ S_2 &= \frac{I_2}{I_3}; S_4 = \frac{I_1}{I_3} \end{aligned} \quad (6)$$

A gyakorlat azt mutatja, hogy az  $S_3$  faktor értéke az általunk alkalmazott donor-akceptor párra (AlexaFluor546-AlexaFluor647) a FacsArray áramlási citométeren általában nulla, így az 5-ös egyenletrendszer megoldására a következőt kapjuk:

$$C = \frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \frac{S_2(I_2 - I_1S_1 - I_3S_2 + I_3S_1S_4)}{I_1S_2 - I_2S_4} \quad (7)$$

Az energiatranszfer hatékonyságát pedig az alábbiak szerint számíthatjuk ki:

$$E = \frac{C}{1+C} \quad (8)$$

Az  $\alpha$  faktor egy olyan, a műszert és az adott donor-akceptor párt jellemző állandó, amely megadja, hogy a műszer adott optikai konfigurációja esetén mekkora egy gerjesztett akceptor molekula FRET csatornában mérhető intenzitása egy gerjesztett donor molekula donor csatornában mérhető intenzitásához képest. A következőképpen számolható:

$$\alpha = \frac{I_{2,A}}{I_{1,D}} \cdot \frac{\varepsilon_D L_D}{\varepsilon_A L_A} \quad (9)$$

ahol  $\varepsilon_D$  a donor moláris abszorpciós koefficiense,  $\varepsilon_A$  az akceptor moláris abszorpciós koefficiense,  $L_D$  és  $L_A$  a donor és az akceptor jelölési aránya (F/P), vagyis az antitestenként felkötődő festék molekulák száma. Az  $\alpha$  faktor számolásához két mintát kell felhasználni: az egyiket egy antitest donorral jelölt változatával, a másikat pedig ugyanazon antitest akceptorral jelölt változatával festjük meg. A csak donorral jelölt minta donor csatornában mért fluoreszcencia intenzitását  $I_{1,D}$ -vel, a csak akceptorral jelölt minta FRET csatornában mérhető intenzitását pedig  $I_{2,A}$ -val jelöljük.

A FRET kísérletekhez a sejteket kétszer mostuk PBS-ben, majd kb. 1 millió sejtet 50  $\mu$ l PBS-ben szuszpendáltunk fel és ezt követte egy 30 perces, jégen való jelölés (sötétben) a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestekkel. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk szintén kétszer és 1%-os formaldehid-PBS eleggyel történt a fixálás [106].

A PLA módszernél főleg a FRET intenzitások ( $I_{FRET}$ ) kiszámítása volt fontos, amit a következő egyenlet szerint számítottunk ki:

$$I_{FRET} = I_d E \alpha, \quad (10)$$

ahol  $I_d$  a ki nem oltott donor intenzitása FRET hiányában és arányos a fehérje expressziós szintjével, amit donor-konjugált antitesttel jelöltünk [106].  $I_{FRET}$  fluoreszcencia jelet az áramlási citometriás FRET csatornában (FarRed) mérhető intenzitásból a spektrális átvilágítások korrekciója után számoltuk ki. A kontúr ábrákat és a trendvonalakat Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA) program segítségével szerkesztettük.

#### **4.8. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok**

A fluoreszcensen jelölt sejtek vizsgálatára Zeiss LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) használtunk. A konfokális képeket 0.5  $\mu$ m-es optikai szeletekről vettük fel 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel, 63 $\times$  (NA=1,4) nagyítású olajimmerziós objektívet használva. A fluoreszcens festékeket és GFP variánsokat argon-ion lézer segítségével gerjesztettük az alábbiak szerint (**III. táblázat**):

<i>fluoreszcens festék</i>	<b>gerjesztés (nm)</b>	<b>detektálás (szűrők)</b>
<b>AlexaFluor488, eGFP</b>	488	505LP
<b>mYFP; citrine</b>	514	530LP

**III. táblázat: A vizsgálatban használt festékek és a konfokális mikroszkóp optikai adatai**

A gerjesztésnél a gerjesztési hullámhosszakot, a detektálásnál a szűrők átteresztési hullámhosszait tüntettem fel.

A képanalízis és az ortogonális projekciók (vetületek) megszerkesztése Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA) programkörnyezetben, DipImage (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) függvényeket felhasználó, általunk írt kiértékelő program felhasználásával történt.

#### **4.9. Fluoreszcencia anizotrópia és generalizált polarizáció mérések**

A feltripszinezett sejteket  $10^7$ /ml-es koncentrációban Hank's pufferben jelöltük 2  $\mu$ M TMA-DPH vagy 2.5  $\mu$ M Laurdan oldattal szobahőmérsékleten, 20 percig. A fluoreszcencia anizotrópia mérésekhez a TMA-DPH-val jelölt mintákat mosás nélkül hígítottuk Hank's pufferrel  $10^6$ /ml koncentrációra, míg a Laurdan-jelölt sejteket egyszer mostuk és szuszpendáltuk Hank's pufferrel  $10^6$ /ml koncentrációra. A méréseket Fluorolog-3 spectrofluoriméteren (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ) végeztük. A küvettatartó hőmérsékletét

37°C-ra állítottuk cirkulációs vízfürdő segítségével. TMA-DPH gerjesztése 352 nm-en történt, az emissziót pedig 430 nm-en mértük. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiáját ( $r$ ) L-formátumban mértük a következő képletnek megfelelően [107, 108]:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}, \quad (11)$$

ahol  $I_{vv}$  és  $I_{vh}$  a vertikálisan polarizált fényvel gerjesztett fluorofórok fluoreszcenciájának vertikális és horizontális komponensei. A  $G$  korrekciós faktor a detektálási rendszer vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre vonatkoztatott különböző érzékenységét jellemzi:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}, \quad (12)$$

ahol  $I_{hv}$  és  $I_{hh}$  a horizontálisan polarizált fényvel gerjesztett molekulák vertikális és horizontális fluoreszcencia komponensei. A lipid molekulák a lipid kettősrétegben elsősorban oldalirányú és forgó mozgást végeznek a membrán fluiditásától függően; az anizotrópia a TMA-DPH festék rotációs mozgását jellemzi (a foszfolipid kettősréteg külső felének poláros fejcsoport-régiójába épül be), és a membránfluiditással fordítottan arányos. Tehát a kisebb  $r$  értékek nagyobb membránfluiditást jelentenek.

A membrán különböző fázisú doménjeinek megoszlását Laurdan segítségével vizsgáltuk, ugyanis ez egy olyan, membránba ékelődő fluoreszcens festék, amelynek emissziós spektrumát a membrán aktuális hidratáltsági szintje befolyásolja. A Laurdan indikátort 350 nm-en gerjesztettük és emisszióját a kék tartományban, 435 nm-en ( $I_{blue}$ ) és spektrumának vörös szélén, 500 nm-en ( $I_{red}$ ) detektáltuk. A fluoreszcens Laurdan generalizált polarizációját (GP) az alábbi képlettel számoltuk [109-111]:

$$GP = \frac{I_{blue} - I_{red}}{I_{blue} + I_{red}} \quad (13)$$

A GP értékét Laurdan fluoreszcenciájának vörös és kék spektrális részeinek aránya határozza meg. Magas membrán rendezettség alacsony lipid és Laurdan hidratációval jár, ami csökkenti a vízmolekulák által a Laurdan spektrumában létrehozott vörös eltolódás mértékét. Tehát ebben az esetben a kék intenzitás értéke nő a vöröshöz képest, ami a GP növekedését eredményezi.

#### ***4.10. Páciensek, humán metszet minták***

ErbB2 overexpressziót mutató emlőtumoros betegeket vontunk be a vizsgálatokba, akiket az Uzsoki utcai Kórházban (Budapest) kezeltek. A mintavétel a műtétek során eltávolított szervrészletből történik, még steril körülmények között, amely nem akadályozta a patológiai feldolgozást, a betegkövetés pedig nem befolyásolta az onkológiai kezelést. A specimenekből eltávolított mintákat azonnal folyékony nitrogénben fagyasztották le és a minta nagyságának megfelelő fagyasztó ampullákban tárolták a következő folyamattig, amikor is 4 µm vastagságú metszeteket készítettek belőlük kriosztát segítségével, majd a jelölésig -70°C-on tárolták őket. Az ErbB2 szintet az Uzsoki utcai Kórház Patológia Osztályán határozták meg hisztopatológiai feldolgozás során paraffinba ágyazott mintákból. Az immunhisztokémiához 4B5 nyúl ErbB2-ellenes monoklonális antitestet használtak (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) [112]. Az ErbB2 amplifikációt FISH módszerrel határozták meg Oncor INFORM rendszert (Ventana Medical Systems) használva a Semmelweis Egyetem 2. számú Patológia Tanszékén [113]. Csak azok a betegek kerültek be a vizsgálatokba, akik erős pozitivitást (2+ vagy 3+) mutattak mindkét teszt során. A klinikai adatok összegyűjtése a betegek utánkövetése során történik. 45 páciens mintáját jelöltük meg. ~15 képet vettünk fel és analizáltunk mindegyik egyén mintájáról. Az átlagéletkor 68 év (5% és 95%-os percentilis 36 és 87 év) volt. A betegek átlagos testsúlya 66 kg volt (5% és 95%-os percentilis 46 és 85 kg). A nők átlag magassága 161 cm volt (5% és 95%-os percentilis 150 és 174 cm). A 45 nőből 7 dohányosnak vallotta magát. A páciensek közül 8-an neoadjuvans kemoterápiát kaptak (cyclophosphamide + doxorubicin + 5-fluorouracil vagy docetaxel). A műtét utáni kezelés (amelyben a betegek nagy része részt vett) tanulmányozása a metszeteken a maszkírozás szempontjából irreleváns, ugyanis a minták a daganateltávolító műtét során lettek összegyűjtve. A vizsgálatban résztvevő betegek korábban beleegyező nyilatkozatot tölthettek ki. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) jóváhagyta (ad.335/PI/2007).

#### ***4.11. Metszetek jelölése és azok vizsgálata konfokális mikroszkóppal***

A metszeteket 4%-os formaldehydes-PBS eleggyel fixáltuk 20 percen át, majd két alkalommal mostuk hideg PBS-sel 5 percen át, majd ezt követően egy kétlépéses blokkolás következett. Először a mintákat 30 percig inkubáltuk 1 mg/ml BSA-t tartalmazó blokkoló pufferben, hogy az aspecifikus jelölést megelőzzük. A második blokkolási lépés során a mintákat 30-30 percig inkubáltuk jelöletlen avidinnel és biotinnal (az endogén biotin blokkoló

kit „A” és „B” komponense, Invitrogen, Carlsbad, CA) a nem specifikus, az endogén biotin esetleges jelölődéséből származó háttér kiküszöbölése miatt. Ez az előkezelés azért szükséges, mert a szövetekben (elsősorban a mitokondriumokban) jelen lévő endogén biotin avidint köthet. Ennek meggátlására használjuk az avidint, a biotin pedig az avidinen maradt biotinkötőhelyek blokkolása miatt elengedhetetlen. Mosás után a mintákat az elsődleges antitestkeverékek jelenlétében inkubáltuk (4°C-on) egy éjen át, amely a következőket tartalmazta: 5 µg/ml OP15 (az ErbB2 intracelluláris epitópja elleni antitest, Calbiochem-Merck Biosciences, Schwalbach, Németország), 5 µg/ml AlexaFluor546-trastuzumab és 5 µg/ml bHABC (hyaluronic acid binding complex), mely Markku Tammi ajándéka volt (University of Eastern Finland, Institute of Biomedicine, Kuopio, Finnország). A bHABC egy biotinilált porc proteoglikán fragment [114], amely specifikusan kötődik a HA molekula dekaszacharidnyi szakaszához. A minták másodlagos jelöléséhez a következő antitesteket alkalmaztuk: 5 µg/ml AlexaFluor488-streptavidin és 5 µg/ml AlexaFluor647-GAMIG (mindkettő Invitrogen). Ezzel az antitest keverékkel egy órán át inkubáltuk a mintákat, majd ismét kétszer mostuk őket és 1%-os formaldehides-PBS eleggyel fixáltuk 20 percen át. A végén a metszeteket ~15 µl Mowiolal (Merck) fedtük le, hogy a fluoreszcencia kioltást megelőzzük, majd vizsgálatuk konfokális mikroszkóppal történt.

A hialuronsav mennyiség csökkentésének trastuzumab kötődésre kifejtett hatásának demonstrálásához néhány metszet mintát a jelölést megelőzően 20 egység/ml Streptomyces hialuronidáz (Sigma-Aldrich, H1136) enzimmel emésztettünk. Az enzimet PBS-ben oldottuk fel, ami proteáz inhibitor koktélt (PIC; Complete Mini, Roche) tartalmazott és ebből 100 µl került a metszetekre. A kontroll mintákat enzim nélküli PBS-PIC oldatban inkubáltuk. Az emésztés egy éjen át 37°C-on történt. Mosás után a minták jelölése következett a fentebb leírtak szerint.

A felvételeket Olympus FV1000 konfokális mikroszkóppal készítettük 60× nagyítású (NA=1,35) olajimmerziós objektívvel. AlexaFluor488, AlexaFluor546 and AlexaFluor647 fluoreszcens festékeket a következő lézerek vonalával gerjesztettük: 488 nm, 543 nm és 633 nm. A három festék emmisszióját a következő spektrális régiókban detektáltuk: 515±15 nm, 590±35 nm és 705±50 nm. A mikroszkóp szenzitivitása és beállítása nap, mint nap változhat, ezért egy intenzitás korrekciót vezettünk be, hogy a különböző napokon felvett képeket össze tudjuk hasonlítani. Rainbow kalibrációs beadokról (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) minden alkalommal képeket vettünk fel és az intenzitásokból korrekciós faktort számoltunk, amelyet a minták konfokális képei intenzitásainak egymásra normálására használtunk.

#### **4.12. Képanalízis, statisztikai kiértékelés**

A képanalízis Matlab programkörnyezetben, DipImage függvényeket felhasználó, általunk írt kiértékelő program felhasználásával történt. Röviden: az intenzitás tendenciát (alacsony frekvenciájú háttér) „top-hat” szűrő segítségével távolítottuk el, majd a kép szegmentálása következett, ahol a sejtmembránhoz tartozó és azon kívüli pixeleket azonosítottuk. A szegmentálásra „k-means clustering”, „region growing” és „manually-seeded watershed” szegmentációs algoritmusokat használtunk és mindig a legjobbat választottuk ki vizuális vizsgálat során [115]. Kiszámítottuk az átlag fluoreszcencia intenzitást sejt és kötőszöveti rostoktól mentes területen és ezt az értéket minden pixelből levontuk a háttérkorrekció során. Minden képre kiszámoltuk az átlagos HABC fluoreszcencia intenzitást (hialuronsav sűrűség) és a pixelenkénti trastuzumab/OP15 hányados átlagát. Ezeket a paramétereket átlagoltuk az egyes páciensekre és a trastuzumab/OP15 arányokat ábrázoltuk a HABC intenzitás függvényében, ahol minden pont egy-egy beteget ábrázol. A lineáris korreláció erősségét Pearson-féle korrelációs koefficiens számításával határoztuk meg. A mintákat három csoportra osztottuk a HA mennyiségének (alacsony, közepes és magas) függvényében, és azok trastuzumab/OP15 arányát hasonlítottuk össze ANOVA, majd Tukey’s HSD teszt használatával. A statisztikai számításokat IBM SPSS segítségével végeztük (Armonk, NY).

#### **4.13. Sejtek aktiválása EGF-fel**

A kísérlet előtt az A431 sejteket 24 órán keresztül éhezettünk 0.1% FBS-t tartalmazó médiumban, tripszinezés után mostuk őket PBS-ben és 100 nM EGF-fel kezeltük 30 percen át, 37°C-on 0.1% BSA-t tartalmazó Hank’s pufferben. A sejteket stimulálásuk után jelöltük FRET vagy PLA kísérletekhez.

#### **4.14. Oligonukleotiddal jelölt antitestek (proximitás próbák) készítése**

Az elsődleges antitestekből 200 µg-ot 4 mg/ml koncentrációban PBS-ben jelöltünk 2 órán át 30×-os moláris feleslegben jelen lévő SANH (succinimidyl 4-hydrazinonnicotinate acetone hydrazone; ThermoScientific) jelenlétében szobahőmérsékleten. A nem kötődött SANH-t gél filtrációval távolítottuk el Bio-Gel P-6 oszloppal (BioRad, Hercules, CA), amit konjugációs pufferrel (100 mM MES, 150 mM NaCl, pH 4.8) ekvilibráltunk. Az antitesteken jelen lévő amino csoportokból az SANH hatására reaktív hidrazinopiridin csoportok keletkeznek, amik aldehid módosított oligonukleotidokkal (TriLink Biotechnologies, San Diego, CA)

konjugálhatók. A reakciót az aldehid módosított „priming” és „non-priming” oligonukleotidok 3.5×-es moláris feleslegének jelenlétében 3 órán keresztül végeztük szobahőmérsékleten („priming” oligonukleotid: 5'-aldehyde-AAA AAA AAA ATA TGA CAG AAC TAG ACA CTC TT-3', „non-priming” oligonukleotid: 5'-aldehyde-AAA AAA AAA AGA CGC TAA TAG TTA AGA CGC TTU UU-3', U=2'O-Metil RNS). Az oligonukleotid többletet HPLC-vel távolítottuk el, Superdex-75 kolonnát használva vagy gél filtrációval Sephadex superfine G-100 oszlop (Pharmacia, Uppsala, Svédország) segítségével. A kiválogatott frakciók koncentrációját gél elektroforézissel becsültük meg és az oligonukleotid-konjugált elsődleges antitestek kötődését immunfluoreszcens eljárással vizsgáltuk.

#### **4.15. PLA vizsgálata konfokális mikroszkóppal**

Egy Zeiss LSM510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) használtunk a sejtekről készült képek felvételéhez. A sejtmagok megjelenítésére Hoechst 33342 kontrasztfestéket használtunk. A lipofil molekula a DNS-hez kapcsolódva válik fluoreszcenssé, így a kék szín jelzi a DNS-t tartalmazó sejtmagot. A konfokális képeket 1 Airy egységre beállított pinhole mérettel vettük fel, 63× (NA=1,4) nagyítású olajimmerziós objektívet használva. A fluoreszcens festékek gerjesztéséhez használt lézer vonalakat és a detektor hullámhosszakát a **IV. táblázat** foglalja össze:

<i>fluoreszcens festék</i>	<i>gerjesztés (nm)</i>	<i>detektálás (szűrők)</i>
<b>Hoechst 33342</b>	351	385-470BP
<b>AlexaFluor488</b>	488	505-550BP
<b>Cy5</b>	633	650LP

**IV. táblázat:** *A vizsgálatban használt festékek és a konfokális mikroszkóp optikai adatai*  
A gerjesztésnél a gerjesztési hullámhosszakát, a detektálásnál a szűrők áteresztési hullámhosszait tüntettem fel.

#### **4.16. Sejtek jelölése „in situ” PLA vizsgálatokhoz**

A feltripszinezett sejteket 10<sup>6</sup>/ml-es koncentrációban mostuk hideg PBS-ben, majd a mintákat 1%-os formaldehydes-PBS eleggyel fixáltuk 10 percen át. Hideg PBS-sel történő kétszeres mosást követően a sejteket 30 percig inkubáltuk blokkoló pufferben (1% BSA-t és 5 µg/ml szonikált lazac sperma DNS-t (Invitrogen) tartalmazó PBS) 37°C-on. Centrifugálás után a blokkoló puffert eltávolítottuk és a sejteket oligonukleotiddal jelölt proximitás próbákkal és fluoreszcens antitestekkel jelöltük 10-20 µg/ml-es koncentrációban 1-2 órán

keresztül 37°C-on 250 µg/ml BSA-t és 2.5 µg/ml lazac sperma DNS-t tartalmazó PBS-ben. A nem kötött proximitás próbák eltávolítására, a sejteket kétszer mostuk TBST-vel (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.05% Tween-20). Ezután a sejteket inkubáltuk összekötő oligonukleotiddal (hibridizációs törzsoldat a Duolink Detection kit 563-ből, Olink Bioscience, Uppsala, Svédország, Kat. szám. 90104) 15 percig, 37°C-on. Majd TBST-vel mostuk a mintákat és inkubáltuk 15 percig Duolink „Ligation” oldattal 37°C-on, ezt követően mosás következett TBST-vel és inkubálás Duolink „Amplification” oldattal 60 percig szintén 37°C-on. Mindezek után ismét mostuk a mintákat egyszer TBST-vel és az RCA reakció termék vizualizálásához hozzáadtunk 25 nM Cy5-jelölt detektor oligonucleotidot (5'-Cy5- CAG TGA ATG CGA GTC CGT CT-3', TriLink Biotechnologies, San Diego, CA), amit detektáló pufferben (0.1 µg/ml lazac sperma DNA, 250 ng/ml BSA, 0.05% Tween-20, 2× SSC) oldottunk. Végezetül mostuk a sejteket TBST-vel és 1% formaldehiddel fixáltuk.

#### **4.17. PLA mérések és kiértékelésük**

FACSCalibur áramlási citométert (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) használtunk a proximitás próbával és a fluorofórral jelölt antitesttel jelölt sejtek analízisére. A készülék két lézerrel van felszerelve (**V. táblázat**). Az oligonukleotid Cy5 jelét használtuk a PLA detektálására, amit 635 nm-en gerjesztettünk és az FL4 csatornában mértünk 661/16 nm sávszűrőt használva. Az AlexaFluor488 festékkel jelölt antitest fluoreszcenciáját 488 nm-en gerjesztettük és az FL1 csatornában detektáltuk 530/30 nm sávszűrő alkalmazásával.

<i><b>FACSCalibur</b></i>	<b>lézer</b>	488	635
	<b>detektor</b>	FL1	FL4
	<b>szűrő</b>	530/30BP	661/16BP

**V. táblázat: A vizsgálatban használt FACSCalibur áramlási citométer optikai adatai**

A lézereknél a gerjesztés hullámhosszát, a detektornál a gyári elnevezést, a szűrőknél pedig a szűrők áteresztési hullámhossz-tartományát jelöltem.

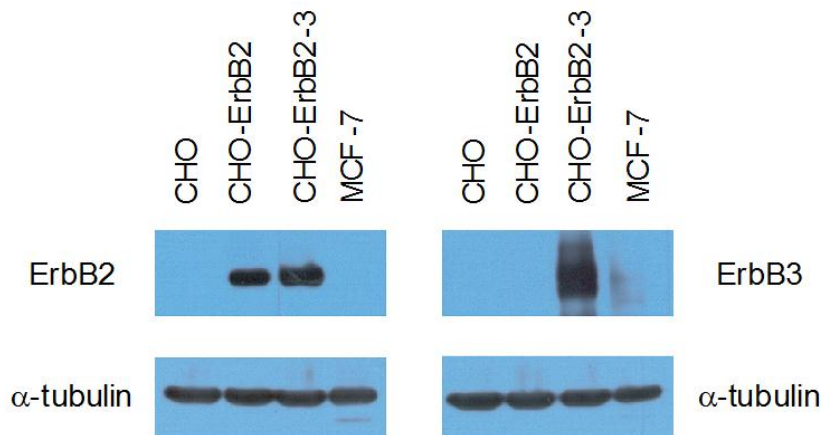
Mintánként 20.000 sejtet vettünk fel és elemeztünk a ReFlex szoftware segítségével [105]. A kétdimenziós hisztogramokat (kontúr ábra) Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA) programmal készítettük. A PLA jel és a fluorofór-kapcsolt antitestek intenzitása közötti korrelációt trend vonal formájába ábrázoltunk Matlab segítségével. Röviden, az X változó tartományát (AlexaFluor488-antitest intenzitása) 30 részre osztottuk, és kiszámítottuk a Cy5-jelölt oligonukleotid átlag intenzitását minden egyes sávban és ezt ábrázoltuk az AlexaFluor488 intenzitás függvényében.

## 5. Eredmények és megbeszélésük

### 5.1. Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata

#### 5.1.1. Az ErbB1-3 expresszió nem befolyásolja a CHO és az A431 sejtek elisidepsin iránti érzékenységet

Korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy az ErbB fehérjék központi szerepet játszanak az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában [74, 76]. Mivel az idézett irodalmi forrásokban az ErbB expresszió és az elisidepsin érzékenység közti korreláció viszonylag gyenge volt, célul tűztük ki, hogy ellenőrizzük a két paraméter közötti összefüggést. Ezért két stabilan transzfektált sejt vonalat hoztunk létre, az ErbB2 fehérjét expresszáló CHO-ErbB2-t és mind az ErbB2-t, mind ErbB3-at expresszáló CHO-ErbB2-3 sejt vonalat. A Western blottal történő ellenőrzés szerint a sejt vonalak az ErbB2 és ErbB3 fehérjéket a vártan megfelelően fejezték ki (9. ábra).

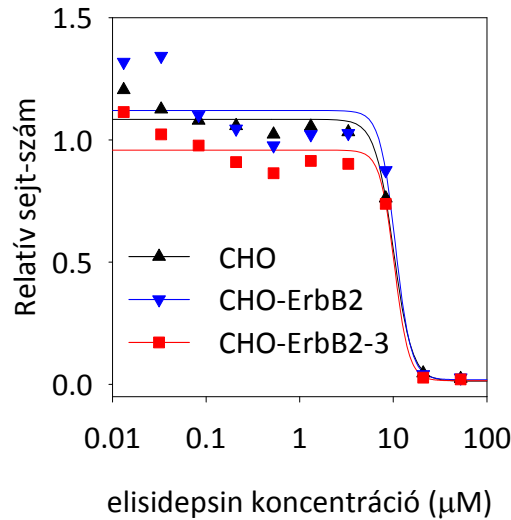


**9. ábra: Az ErbB2 és ErbB3 fehérjék ellenőrzése Western-blottal.** Az MCF-7 emlődaganatból, az eredeti és a transzfektált CHO sejtekből nyert teljes sejt-lizátumot SDS-PAGE-dzsel választottuk el, majd egy ErbB2 és egy ErbB3 ellenes antitesttel blottoltuk. A membránról az ErbB2 és ErbB3 ellenes antitesteket eltávolítottuk („stripping”) és újra blottoltuk egy  $\alpha$ -tubulin ellenes antitesttel az azonos mennyiségű sejt-lizátumok kontrolálása céljából.

Az ErbB fehérjék kifejeződésének mértékét kvantitatívan is ellenőriztük áramlási citométer segítségével. A CHO sejt vonal nem fejez ki ErbB proteineket detektálható mértékben, amint azt már korábban le is írták [99, 100], a CHO-ErbB2-3 sejtek  $\sim 2 \times 10^5$  ErbB2-t és  $\sim 10^5$  ErbB3-at fejeznek ki. Azt találtuk, hogy az ErbB2 mennyisége összemérhető a CHO-ErbB2 és a CHO-ErbB2-3 sejtekben (lásd **I. táblázat**).

Hogy felfedjük az elisidepsin hosszútávú hatását az eredeti CHO sejt vonal és az ebből származtatott, fentebb említett sejt vonalak életképességére, különböző koncentrációjú

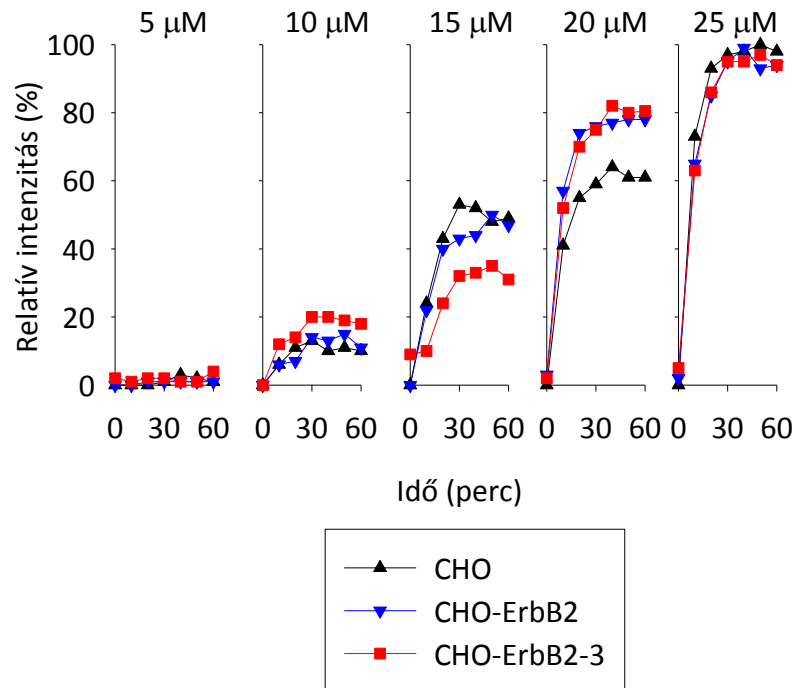
elisodepsinnel kezeltük őket 2 órán keresztül és mosást követően tovább hagytuk nőni még 3 napig. A sejtszámmal arányos normalizált abszorbancia értékeket az elisodepsin koncentráció függvényében ábrázoltuk, és a mérési pontokból az IC<sub>50</sub> értékeket a (2)-es képlet illesztéséből kaptuk. A három sejtvonal között nem találtunk különbséget az elisodepsin érzékenység szempontjából (IC<sub>50</sub>-CHO: 10,0 ± 0,7 μM; IC<sub>50</sub>-CHO-ErbB2: 10,5 ± 0,9 μM; IC<sub>50</sub>-CHO-ErbB2-3: 10,3 ± 0,8 μM; p>0.1 variancia analízis használatával, **10. ábra**).



**10. ábra: Hosszútávú életképesség vizsgálat a vad-típusú és transzfektált CHO sejtekkel** Kezeletlen CHO, CHO-ErbB2 és CHO-ErbB2-3 sejteket tettünk ki 96-lyukú sejttenyésztő edénybe és a triplikátumokat elisodepsinnel kezeltük 2 órán keresztül. Mosást követően tovább hagytuk őket növekedni még 3 napig és a sejtszámot a kísérlet végén WST-1 reagens használatával határoztuk meg. A kezeletlen sejtekkel normalizált sejtszámot tüntettük fel az elisodepsin koncentrációjának függvényében. A görbék a (2)-es képlet illesztéséből származnak.

Az elisodepsin hatása a túlélésre/proliferációra nem változott jelentősen, ha a droggal történő kezelést 2 órától 3 napra növeltük, ami arra enged következtetni, hogy a drog nagyon korán kifejti hatását.

Az elisodepsin rövidtávú hatásának vizsgálatához és a drog-indukálta sejthalalozás időfüggésének felfedéséhez a vizsgált három sejtvonalat különböző elisodepsin koncentrációkkal kezeltük, és a PI felvételt mikrofluorimetria segítségével követtük 1 órán át. A drog által kiváltott membrán permeabilizáció mértéke és kinetikája összehasonlítható volt mindhárom sejtvonal esetében, mivel a fluoreszcencia intenzitás nem mutatott jelentős különbséget a variancia analízis során (p>0.1, **11. ábra**).



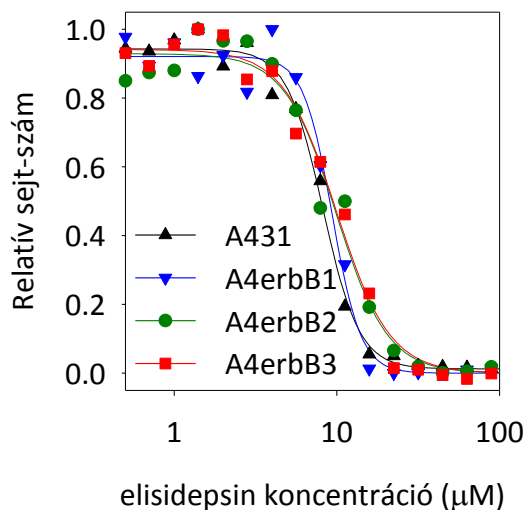
**11. ábra: Rövidtávú életképesség vizsgálat transzfektálatlan és stabilan transzfektált CHO sejtekkel**

Konfluens CHO, CHO-ErbB2 és a CHO-ErbB2-3 sejteket kezeltünk a feltüntetett elisidepsin koncentrációkkal 60 percig és a PI felvételt a kezelés során mikrofluorimetriásan követtük. A fluoreszcencia intenzitásokat normáltuk a legnagyobb koncentrációval kezelt minta maximális intenzitás értékével.

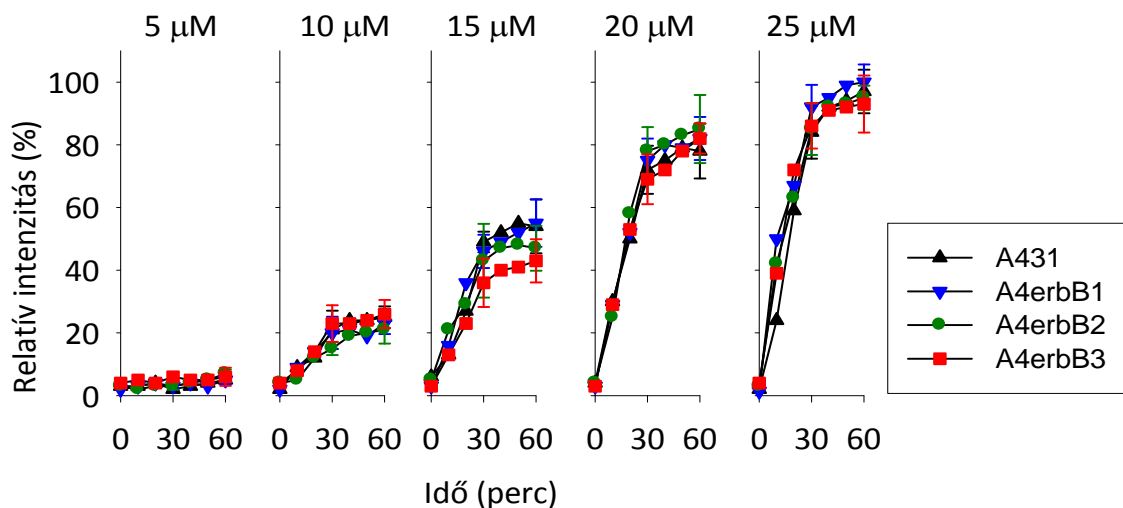
Két ANOVA tesztet végeztünk, 30 és 60 percnél mért intenzitásokkal és nem láttunk szignifikáns különbséget a sejtvonalak között ( $p > 0,1$ ).

Tehát sem az ErbB2, sem az ErbB3 fehérjék expressziója nem befolyásolja a CHO sejtek elisidepsin iránti érzékenységét akár a rövidtávú, akár a hosszútávú hatás szempontjából.

Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az ErbB fehérjék hatásának hiánya nem valami CHO-ra specifikus jelenség, vizsgálni kezdtük a rövid-, és hosszútávú hatásokat A431 sejteken és ennek különböző ErbB proteinekkal (ErbB1-eGFP, ErbB2-mYFP, ErbB3-citrine) transzfektált származékain (A4erbB1, A4erbB2 és A4erbB3 sejtek). Ezen sejtvonalak ErbB expresszióját az **I. táblázat** foglalja össze. Hasonlóan a CHO sejtekhez, az ErbB proteinek (ErbB1-3) jelenléte az A431 sejtekben nem változtatta meg sem a hosszútávú (**12. ábra**), sem a rövidtávú (**13, 14. ábra**) hatásokat, ugyanis ezek vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns eltérést a négy sejtvonala között ( $IC_{50}$ -A431:  $8,2 \pm 0,8 \mu M$ ;  $IC_{50}$ -A4erbB1:  $9,4 \pm 0,5 \mu M$ ;  $IC_{50}$ -A4erbB2:  $9,9 \pm 1,0 \mu M$ ;  $IC_{50}$ -A4erbB3:  $9,9 \pm 0,9 \mu M$ , ANOVA,  $p > 0,1$ ).

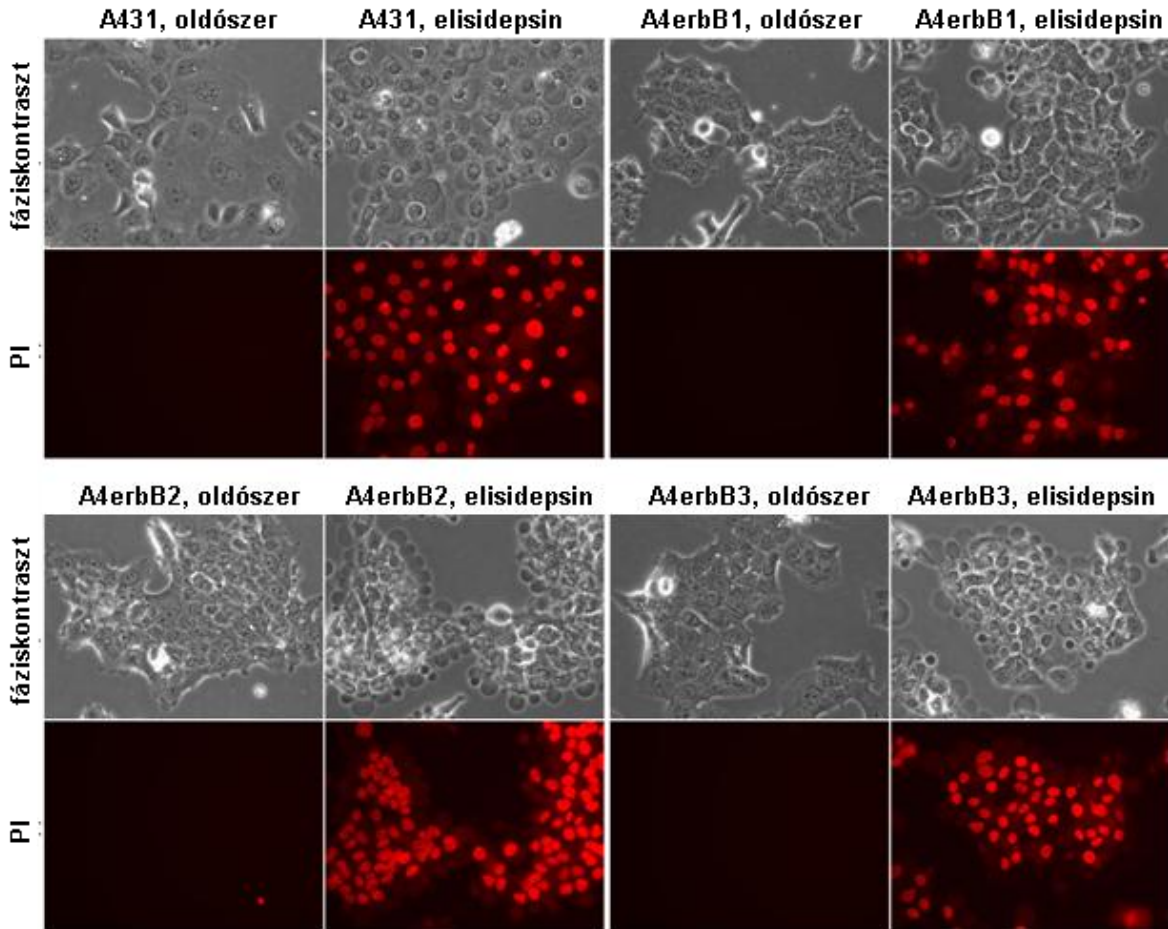


**12. ábra: Hosszútávú életképesség vizsgálat vad-típusú és transzfektált A431 sejtekkel**  
Kezeletlen A431, valamint ErbB1-eGFP-vel (A4erbB1), ErbB2-mYFP-vel (A4erbB2) és ErbB3-citrine-nel (A4erbB3) transzfektált A431 sejteket tettünk ki 96-lyukú sejtenyésző edénybe és a triplikátumokat elisidepsinnel kezeltük 2 órán keresztül. Mosást követően tovább hagytuk őket növekedni még 3 napig. A kezeletlen sejtekkel normált sejtszámot tüntettük fel az elisidepsin koncentrációjának függvényében. A görbék a (2)-es képlet illesztéséből származnak.



**13. ábra: Rövidtávú életképesség vizsgálat transzfektálatlan és transzfektált A431 sejtekkel**

Konfluens A431, A4erbB1, A4erbB2, A4erbB3 sejteket kezeltünk a feltüntetett elisidepsin koncentrációkkal 60 percen keresztül és a PI felvételt a kezelés során mikrofluorimetriásan követtük. A fluoreszcencia intenzitásokat normáltuk a legnagyobb koncentrációval kezelt minta maximális intenzitás értékével. A statisztikai elemzés a **11. ábra**-magyarázatban leírtak szerint történt.



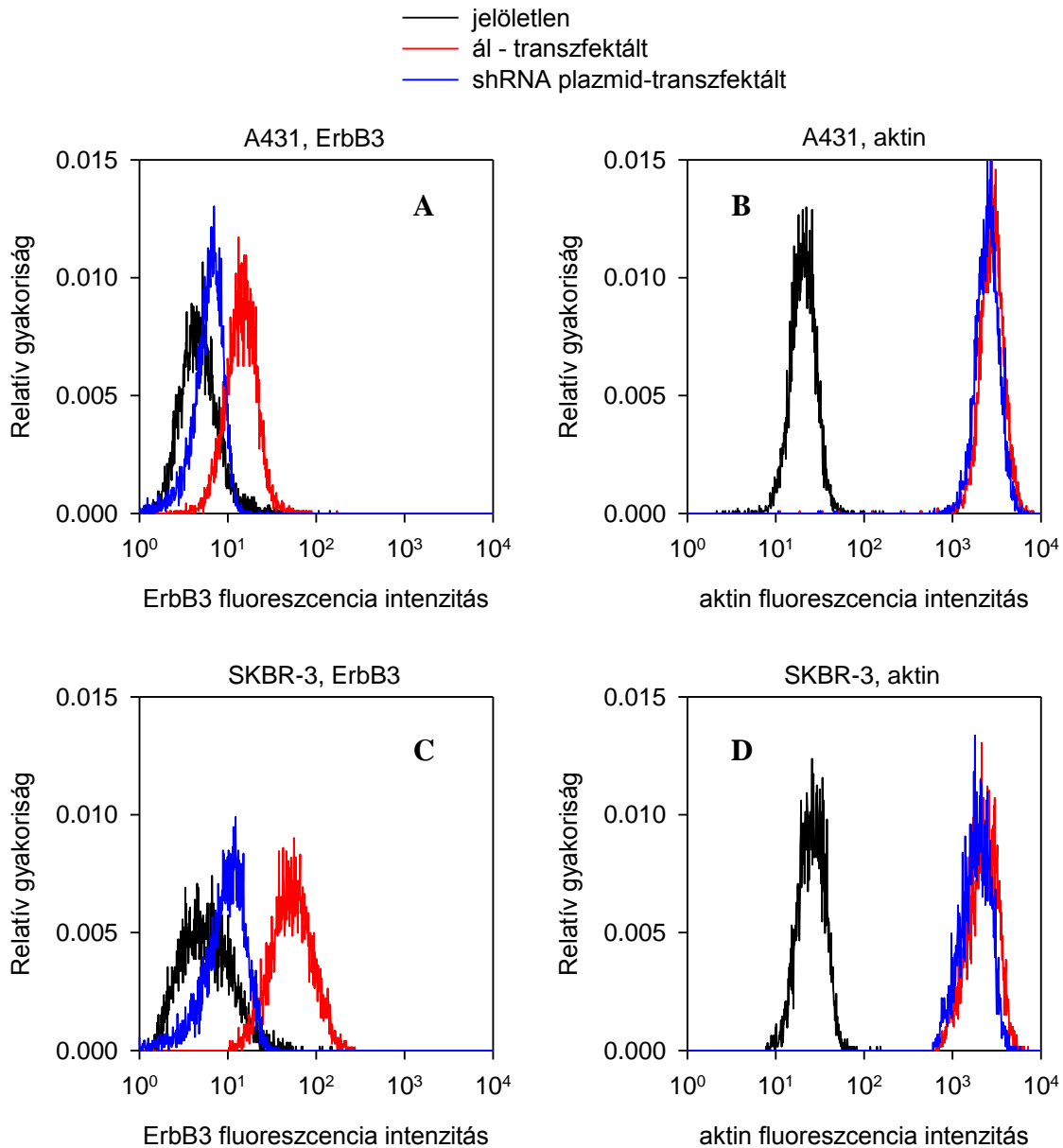
**14. ábra: Az elisidepsin rövidtávú hatásának fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata transzfektálatlan és transzfektált A431 sejtekkel**

Transzfektálatlan, valamint ErbB1-eGFP-vel (A4erbB1), ErbB2-mYFP-vel (A4erbB2) és ErbB3-citrine-nel (A4erbB3) transzfektált A431 sejteket kezeltünk elisidepsinnel, majd ezeket a sejtvonalakat és a kezeletlen mintákat is jelöltük PI-dal 30 percen keresztül, hogy a fluoreszcens és a fáziskontraszt képeket felvegyük.

Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy az elisidepsin által indukált citotoxikus hatás egy gyors folyamat és az ErbB1, ErbB2 és ErbB3 proteinek kifejeződése nem befolyásolja a sejtek drog iránti érzékenységét.

Az, hogy az ErbB3 expresszióknak nincs vagy csak nagyon gyenge hatása van a sejtek elisidepsin iránti érzékenységére, arra enged következtetni, hogy az ErbB3 nem befolyásolja a sejtek drog iránti szenzitivitását. Korábbi közlemények azt állították, hogy az ErbB3-nak szerepe van a hatóanyag hatásmechanizmusában, ami nyilvánvaló ellentmondásban van saját eredményeinkkel. Hogy saját állításunkról bizonyosságot nyerjünk, RNS interferenciával gátoltuk az ErbB3 termelődést mind A431 sejteken, mind SKBR-3 sejtvonalon, amelynek alacsonyabb az IC<sub>50</sub> értéke ( $1,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ). ErbB3 shRNA plazmiddal történő transzfekció

után 2 nappal az ErbB3 expressziós szintje ~85%-kal lecsökkent, ami ~500 és ~2500 ErbB3 molekula/sejt értéknek felel meg A431 és SKBR-3 sejtek esetében.

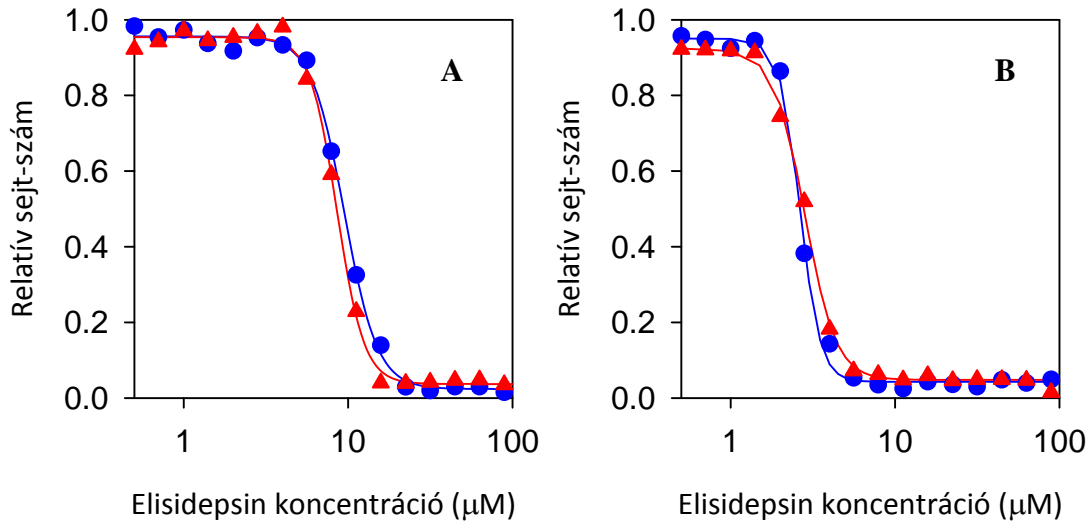


**15. ábra: Az ErbB3 expresszió gátlása RNS interferencia segítségével**

A431 és SKBR-3 sejteket elektroporációval transzfektáltuk ErbB3 ellenes shRNS-t termelő plazmival. 60 órával a transzfekció után, a sejteket felvettük, fixáltuk, permeabilizáltuk és egy elsődleges, fluoreszcensen jelzett ErbB3 elleni antitesttel (H3.90.6) jelöltük (**A, C ábra**). Azért hogy bizonyítsuk, hogy a transzfekciónak és a shRNS termelődésének nincs szignifikáns hatása egy irreleváns gén expressziójára, a fixált és permeabilizált sejteket megjelöltük egy monoklonális aktin elleni antitesttel (AC40 klón, Sigma-Aldrich), majd egy másodlagos jelölést alkalmaztunk A647-GAMIG antitesttel (**B, D ábra**).

Az IC<sub>50</sub> értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a transzfektált és a kontroll sejtek között (IC<sub>50</sub>-ál-transzfektált SKBR-3: 2,64 ± 0,8 μM; IC<sub>50</sub>-ErbB3 shRNS transzfektált

SKBR -3:  $2,82 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}$ -ál-transzfektált A431:  $9,48 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}$ -ErbB3 shRNS transzfektált A431:  $8,55 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ), ami megerősíti állításunkat, miszerint sejtek elisidepsin érzékenysége nem függ az ErbB fehérje expressziótól (**16. ábra**).



**16. ábra: RNS interferencia által elfojtott ErbB3 expresszió nem befolyásolja az elisidepsin érzékenységet**

A431 (A) és SKBR-3 (B) sejteket transzfektáltunk ErbB3 elleni shRNS-t expresszáló plazmiddal. Kontroll, azaz ál-transzfektálást is végeztünk plazmid nélkül. A transzfektáció után 60 órával triplikátumban kezeltük a sejteket 2 órán keresztül különböző elisidepsin koncentrációkkal, majd mosást követően tovább hagytuk őket nőni még 3 napig.

Korábbi beszámolóinkban leírták, hogy az ErbB3 [74] vagy az ErbB1-3 fehérjék [76] kulcsfontosságú faktorok a Kahalalide F és az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában. Saját kísérleteinkben a CHO és az A431 sejtvonalak elisidepsin-érzékenysége nem korrelált az ErbB proteinek expressziós szintjével, ezért megkérdőjelezhető, hogy van-e döntő szerepe az ErbB receptoroknak az elisidepsin iránti szenzitivitás meghatározásában. Különösen az a felismerés, hogy sem az ErbB2, sem az ErbB2 és ErbB3 kifejeződése vad típusú CHO sejtekben (melyek nem mutatnak ErbB1, -3 és -4 expressziót, de nagyon gyenge ErbB2-t viszont igen) nem változtatta meg az érzékenység mértékét, egyértelművé tette, hogy az ErbB2 és ErbB3 fehérjék nem vesznek részt a mechanizmusban. Az ErbB3 jelentőségének hiányát az ErbB3 expresszió RNS-interferencia segítségével történő gátlásával is megerősítettük. Kizártuk annak a lehetőségét, hogy a transzfektált ErbB proteinek működésképtelenek lettek volna, mert az EGF és a heregulin tirozin-foszforilációt indukált (adatokat itt nem mutatunk be). Következésképpen úgy

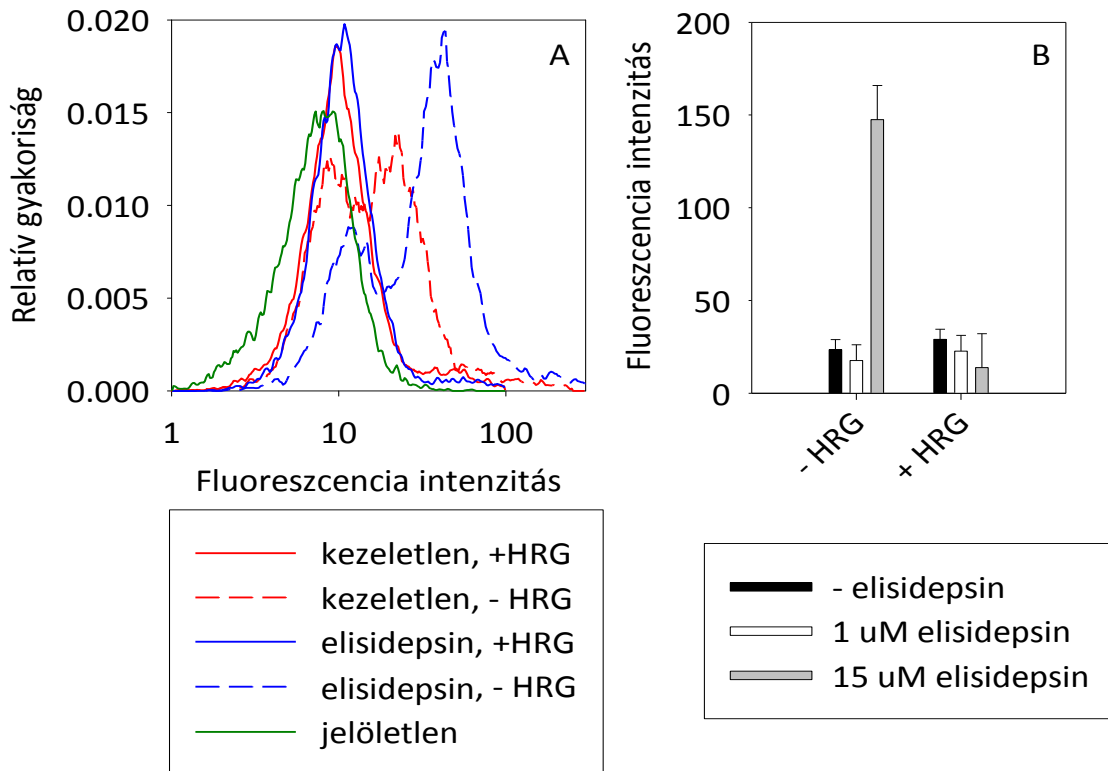
gondoljuk, hogy a közölt korreláció az elisidepsin-szenzitivitás és az ErbB receptorok expressziója között

- vagy egy indirekt hatás, amely az ErbB fehérje expresszióinak a sejtek életképességére kifejtett általános hatásának tudható be (pl. az Akt szignalizációs útvonal aktiválása miatt)
- vagy nem teljesen megalapozott következtetés, amelyhez a túlzottan alacsony korrelációs koefficiensek túlértékelése vezetett.

A különböző sejtvonalakon általunk mért IC<sub>50</sub> értékek magasabbak voltak, mint azt korábban publikálták [76]. Véleményem szerint a különbség annak tudható be, hogy különböző metodikát használtunk a korábbi vizsgálatokhoz képest. A korábbi, alacsonyabb IC<sub>50</sub> értéket közlő cikkekben az elisidepsint több napon (általában 72 h) keresztül alkalmazták. Mi a rövid időtartamú kezelés mellett döntöttünk, ugyanis a Kahalaide F emberi szervezetben mért felezési ideje ~ 30 perc, vagyis a rövid *in vitro* elisidepsin kezelés hasonló az *in vivo* helyzethez [71].

### **5.1.2. Az elisidepsin specifikusan megnövelte egy konformáció-szenzitív ErbB3 ellenes antitest kötődését**

Az előző részben ismertetett eredmények cáfolják az ErbB proteinek szerepét az elisidepsin iránti szenzitivitás meghatározásában, de nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy a drognak indirekt hatása van az ErbB fehérjékre. Ezért számos kísérletet hajtottunk végre annak ellenőrzésére, hogy az elisidepsin milyen hatást gyakorol az ErbB fehérjékre. Először vizsgáltuk, hogy ErbB2 vagy ErbB3 antitestek kötődését 15 µM elisidepsin hogyan befolyásolja. Elisidepsin-kezelt és kontroll CHO-ErbB2-3 sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és fluoreszcens antitesttel jelöltünk, amit egy áramlási citometriás mérés követett. Mivel a jelölés permeabilizált sejteken történt, ezért a mért fluoreszcencia intenzitások az antigén teljes mennyiséget tükrözik. Habár az elisidepsin nem módosította kétféle ErbB2-ellenes antitest (trastuzumab, pertuzumab) és kétfajta ErbB3-ellenes antitest (H3.90.6, H3.90.12) kötődését, szignifikánsan fokozta a H3.105.5 antitest epitópjának mennyiségét vagy hozzáférhetőségét (**17-18 ábra**).



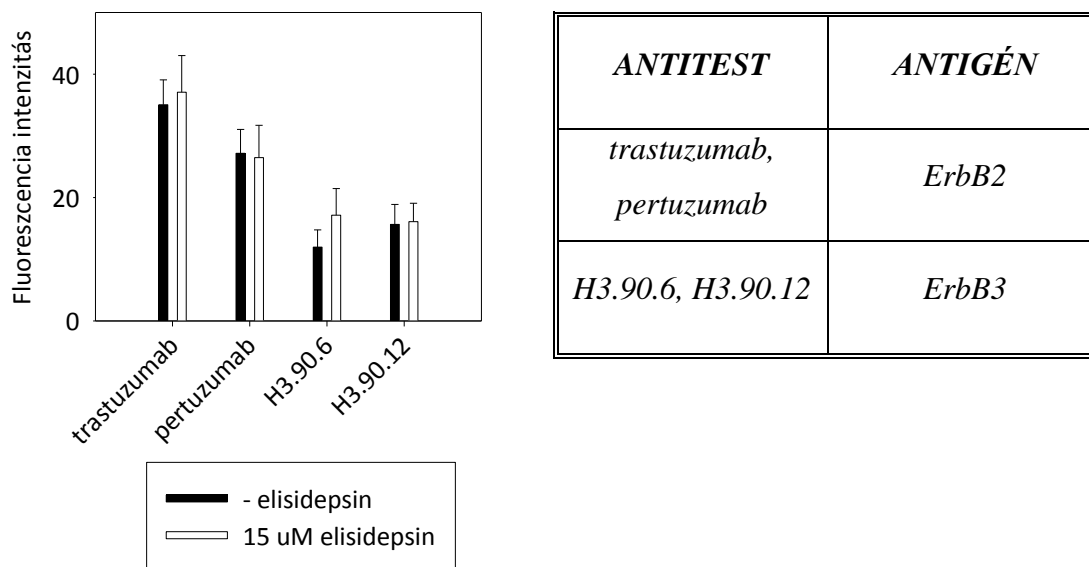
**17. ábra: Elisidepsin által indukált változások az ErbB2 és ErbB3 ellenes antitestek kötődésében**

**A:** Kontroll CHO-ErbB2-3 sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és fluoreszcens ErbB3-ellenes H3.105.5 antitesttel jelöltünk, heregulin jelenlétében (piros folytonos vonal), illetve annak hiányába (piros szaggatott vonal). Azok a sejtek, amelyeket 15  $\mu$ M elisidepsinnel kezeltünk 30 percig szintén jelölve voltak H3.105.5 antitesttel, heregulin nélkül (kék szaggatott vonal) vagy heregulin jelenlétében (kék folytonos vonal). A fluoreszcens hisztogramot 10.000 jelölt és jelöletlen sejtről (zöld vonal) áramlási citometriás módszerrel vettük fel. A mérések átlagait a B ábrán tüntettük fel.

**B:** Fixált és permeabilizált kontroll CHO-ErbB2-3 sejtek (fekete), valamint 1  $\mu$ M (fehér) és 15  $\mu$ M (szürke) elisidepsin kezelésnek kitett sejteket jelöltünk fluoreszcens H3.105.5 antitesttel heregulin jelenlétében (+HRG), illetve heregulin nélkül (-HRG). Három különböző mérés háttér-korrigált átlag fluoreszcencia intenzitásait tüntettük fel az ábrán ( $\pm$ SEM).

Elisidepsin kezelés hiányában a H3.105.5 antitest kötődése a CHO-ErbB2-3 sejtekhez elhanyagolható volt, viszont az antitest kötődését a kezelés szignifikánsan fokozta. A H3.105.5 antitest megnövekedett kötődését heregulinval lehet gátolni. Az ErbB3 heregulin liganduma kompetál a H3.105.5 antitesttel. Az, hogy heregulin jelenlétében a H3.105.5 antitest kötődése minden esetben jelentősen csökkent, azt bizonyítja, hogy az antitest kötődése specifikus volt. Eredményeink arra utalnak, hogy az elisidepsin egy olyan

konformációbeli változást indukál az ErbB3 fehérjében, ami a H3.105.5 antitest epitópjához való hozzáférést befolyásolja.



**18. ábra: Az elisodepsin nem indukál változásokat más ErbB2 és ErbB3 ellenes antitestek kötődésében**

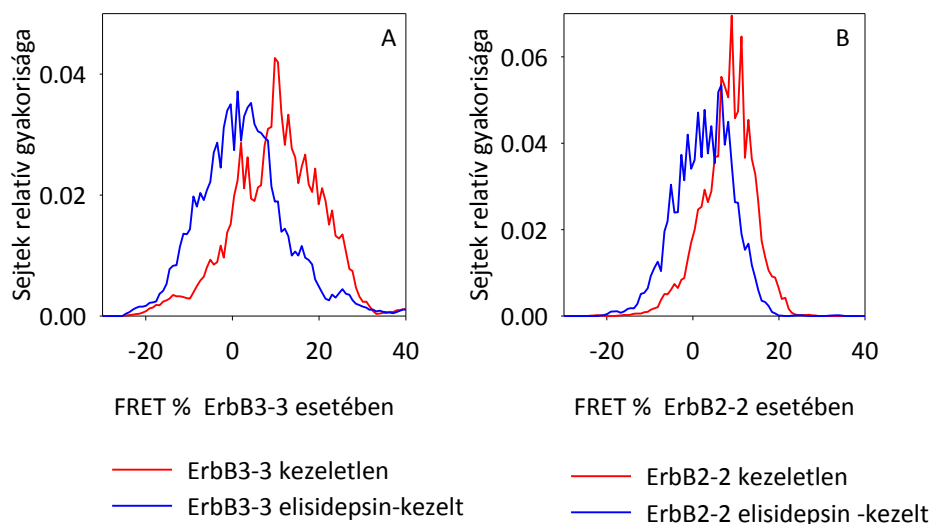
Fixált és permeabilizált kontroll CHO-ErbB2-3 sejtek (fekete oszlop) és 15  $\mu$ M elisodepsinnel kezelt sejteket (fehér oszlop) jelöltünk fluoreszcens trastuzumabbal, pertuzumabbal (mindkettő ErbB2 ellenes antitest), H3.90.6 vagy H3.90.12 (mindkettő ErbB3 ellenes antitest). Három különböző áramlási citometriás mérés háttérrel korrigált átlag fluoreszcencia intenzitásait tüntettük fel az ábrán ( $\pm$ SEM).

Elmondhatjuk, hogy az elisodepsin kezelés a H3.105.5 esetében okozott számottevő mértékű kötődésváltozást, ami egy konformáció-érzékeny ErbB3 ellenes antitest. A kötődés növekedésének specifikusságát az nyomatékosítja, hogy az elisodepsin-indukált hatások hiányoznak más típusú antitestek kötődésénél és a heregulin visszafordítja a H3.105.5 kötődés növekedését. Feltételezésünk szerint a drog nem okoz azonnali változást sem az ErbB2, sem az ErbB3 expressziós szintjében (hiszen két ErbB2 ellenes, és két ErbB3 ellenes antitest kötődése nem változott). A H3.105.5 antitest kötődésének változását valószínűleg az ErbB3 konformációjában vagy klaszterizációjában beálló változások okozzák, amelyek megváltoztatják az epitóp elérhetőségét. Az elisodepsin az ErbB3 klaszterek szétszakadását idézi elő [116], amit a saját, később ismerttetendő FRET kísérleteink is alátámasztanak, és ez vezethet a konformáció változáshoz és következményként a H3.105.5 epitóp elérhetőségének változásához. Valószínű, hogy mindezen események mögött az elisodepsin által kiváltott, a későbbi alfejezetekben leírandó, membránváltozások a felelősek.

Ezekre az antitest kísérletekre alapozva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az elisidepsin nem növeli meg a nem-specifikus kötődést mindenféle ErbB2 vagy ErbB3 ellenes antitest esetében, nem növeli meg az ErbB3 mennyiségét a sejtben, de megváltoztatja annak konformációját.

### 5.1.3. Az elisidepsin csökkentette az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációját

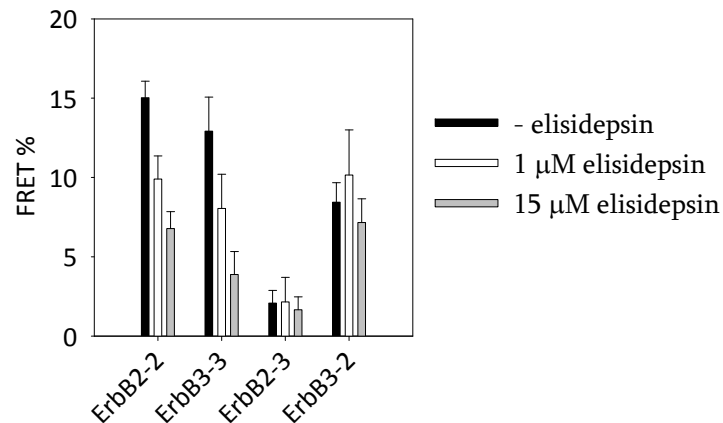
Egy fehérje direkt vagy indirekt közreműködését egy drog hatásában gyakran az adott fehérje megváltozott asszociációs állapotával tudjuk jellemezni. Mivel az előbb említett kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az ErbB3 konformációja valószínűleg módosult elisidepsin kezelés hatására, ezért vizsgálni kívántuk, hogy vajon az ErbB2 és ErbB3 homo- és heteroasszociációja hogyan változik a kezelést követően. Áramlási citometriás FRET méréseink mutatják, hogy az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjában szignifikáns csökkenés jelentkezett elisidepsin kezelés során (**19. ábra**), míg ezen fehérjék heteroasszociációja nem változott jelentősen (**20. ábra**).



#### 19. ábra: Az elisidepsin által indukált változások az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjában

**A:** CHO-ErbB2-3 sejteket kezeltünk 15  $\mu$ M elisidepsinnel 30 percen át, majd ezt követte a kontroll (piros vonal) és elisidepsin-kezelt (kék vonal) sejtek jelölése donor- és akceptor-konjugált ErbB3 ellenes antitestek keverékével (H3.90.6). A FRET hatékonyságát 10.000 sejten határoztuk meg áramlási citométer segítségével.

**B:** Kontroll CHO-ErbB2-3 sejteket (piros vonal) és 30 percen keresztül 15  $\mu$ M elisidepsinnel kezelt (kék vonal) sejteket jelöltünk donor- és akceptor-konjugált ErbB2-ellenes antitestek keverékével (trastuzumab) és a FRET hatékonyságát 10.000 sejtre határoztuk meg áramlási citometriával.



**20. ábra: Az elisidepsin által indukált változások az ErbB2 és ErbB3 homo- és heteroasszociációjában**

Kontroll sejtek (fekete oszlop), valamint 1 μM (fehér oszlop) vagy 15 μM (szürke oszlop) elisidepsinnel kezelt sejteket vizsgáltunk áramlási citometriás FRET mérésekkel. ErbB2-2 és ErbB3-3 jelöli az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációt. Az ErbB2-3 az ErbB2 és ErbB3 heteroasszociációját jelenti akkor, amikor az ErbB2-t a donorral jelöltük, az ErbB3-at pedig az akceptorral jelölt antitesttel festettük meg. A donor és akceptor fluorofórokat megcseréltük az ErbB3-2-vel jelzett mintáknál, vagyis az ErbB2-t az akceptor-konjugált antitesttel, míg az ErbB3-at a donor-konjugált antitesttel jelöltük meg. Az oszlopdiaagram reprezentálja a három különböző mérés átlagát és annak hibáját (±SEM).

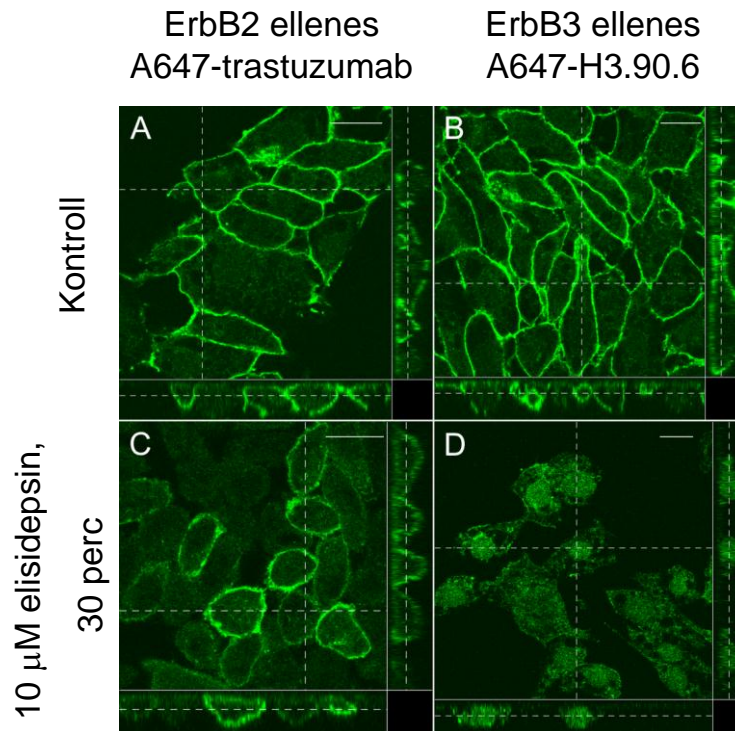
Az ErbB2 és ErbB3 heteroasszociáció esetében a FRET hatékonyságokat határozottan megváltoztatta a donorral és akceptorral jelölt antitestek felcserélése. Ez összefüggésben van azzal, hogy a FRET hatékonyságot jelentősen befolyásolja az akceptor mennyisége [117]. Mivel a CHO-ErbB2-3 sejtekben az ErbB2 expressziós szintje magasabb, mint az ErbB3-é, ezért az elmélettel összhangban akkor kaptunk magasabb FRET értékeket, amikor az ErbB2-t jelöltük akceptorral konjugált antitesttel. Az elisidepsin indukálta hatások az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjára dóziszfüggőek voltak és a homoasszociációra gyakorolt hatás kiváltásához szükséges hatóanyag koncentrációk hasonlóak voltak a citotoxikus hatáshoz szükséges koncentrációhoz. A megfigyelések arra utalnak, hogy bár sem az ErbB2, sem az ErbB3 nem játszik szerepet a sejtek elisidepsin iránti érzékenységének meghatározásában, a gyógyszer mindkét molekula homoasszociációját befolyásolja, valószínűleg indirekt módon.

Tehát az áramlási citometriás FRET mérések elisidepsin indukált ErbB2 és ErbB3 homoasszociáció csökkenést mutattak ki, míg a heteroasszociációkban nem tapasztaltunk mérhető változást. Mind az ErbB2, mind az ErbB3 nagyméretű asszociátumokat képez, melyek több tíz proteint is tartalmaznak aktiválatlan sejtek esetében [7, 116]. Feltételezésünk szerint a nagy fehérje klaszterek az elisidepsin által indukált membrán módosulások

eredményeképpen (lásd 5.1.5. alfejezet) szakadnak szét, és ez eredményezheti az ErbB2 és ErbB3 homoasszociáció csökkenését [77]. Ezen feltételezést alátámasztja az, hogy a membrán-közvetített kölcsönhatások alapvető szerepet játszanak a nagy protein aggregátumok kialakulásában [118]. Másrészt, a direkt protein-protein interakciók, amelyekről nem várt, hogy módosulnának az elisidepsin által kiváltott membrán-károsodástól, felelősek a kis protein klaszterek kialakulásáért. Feltételezzük, hogy az ErbB2 és ErbB3 molekulák heteroklaszterei sokkal kisebb méretűek, mint ezen molekulák homoasszociátumai. Habár a hagyományos áramlási citometriás FRET mérések nem tökéletesen alkalmasak a klaszter méret meghatározására [119], de a heterodimerizációra kapott kisebb FRET értékek a homoasszociációhoz képest összhangban állnak azzal, hogy az ErbB2-3 heteroklaszterek kisebb méretűek, mint ezen fehérjék homoklaszterei.

#### **5.1.4. Az elisidepsin megváltoztatta az ErbB3 és a lipid tutaj fehérjék (GPI-horgonyzott GFP, PLAP) eloszlását**

A FRET mérések szenzitívek a fehérjék egymás közötti kölcsönhatásának kimutatásában, de a molekulák eloszlásáról és azok klaszterbe rendeződéséről mikrométeres skálán nem adnak felvilágosítást. Ezért ahhoz, hogy a drog hatását vizsgáljuk a fentebb említett dimenziókban, kontroll és elisidepsin-kezelt CHO-ErbB2-3 sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és jelöltünk fluoreszcens ErbB2 és ErbB3 ellenes antitestekkel. A konfokális mikroszkóppal felvett képek meggyőzően mutatják, hogy az elisidepsin nem módosította az ErbB2 elrendeződését (főleg membrán-jelölődés volt megfigyelhető, hasonlóan a kontroll mintához), míg az ErbB3 eloszlását szignifikánsan megváltoztatta. Ez abban nyilvánult meg, hogy a fehérje a plazmamembránból az intracelluláris térbe transzlokálódott, ahol részben diffúz eloszlást vagy a sejtmagban történő felhalmozódásra jellemző eloszlást mutatott (**21. ábra**).



**21. ábra:** Az elisidepsin az ErbB3 átrendeződését indukálta, míg az ErbB2 eloszlását nem módosította CHO sejtekben

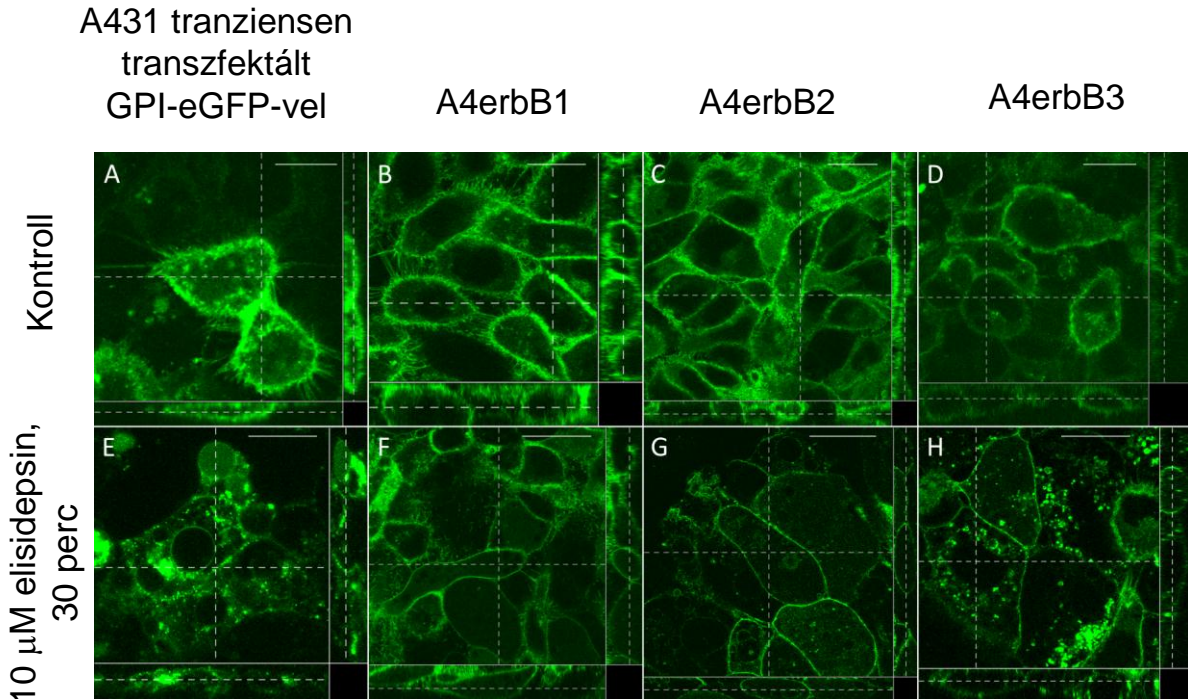
**A, C:** Kontroll (A) CHO-ErbB2-3 és 30 percig 10  $\mu$ M elisidepsinnel kezelt (C) sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és AlexaFluor647-konjugált ErbB2 ellenes trastuzumabbal jelöltünk.

**B, D:** Kontroll (B) és elisidepsin-kezelt (D) CHO-ErbB2-3 sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és AlexaFluor647-konjugált ErbB3 ellenes H3.90.6 antitesttel jelöltünk. A konfokális mikroszkóppal felvett képek ortogonális metszetét mutatjuk be. A méretet jelző fehér referenciavonal 10  $\mu$ m-nek felel meg.

Az elisidepsin szelektív hatásának megerősítésére ErbB1-3 fehérjék fluoreszcens proteinnel fuzionált változatával transzfektált A431 sejteket is megvizsgáltunk. Míg az elisidepsin (10  $\mu$ M) nem volt hatással az ErbB1 és ErbB2 tipikus membrán lokalizációjára, addig az ErbB3 intracellulárisan felhalmozódott a kezelés hatására, ami gyakran mutatott intracelluláris vezikulákra jellemző eloszlást (**22. ábra**).

Mivel valószínűleg a lipid tutajoknak is szerepe van az elisidepsin hatásmechanizmusában [78], megvizsgáltuk az elisidepsin hatását több lipid tutajban található fehérje eloszlására. Ismert, hogy a GPI-horgony a lipid tutajokba lokalizálja a fehérjéket [79, 120], ezért először GPI horgonyzott eGFP-fel tranziensen transzfektált A431 sejteken vizsgáltuk az elisidepsin hatását. Kezeletlen sejtekben a GPI-eGFP jelent volt mind a

plazmamembránban, mind az intracelluláris vezikulumokban, de 10  $\mu$ M elisidepsin hatására szinte teljes egészében az intracelluláris vezikulumban halmozódott fel (22. ábra).



**22. ábra:** Az elisidepsin főleg a GPI-horgonyzott eGFP és az ErbB3 internalizációját indukálja az A431 sejtekben

GPI-eGFP, ErbB1-GFP, ErbB2-mYFP vagy ErbB3-citrine-t kifejező A431 sejteket kezeltünk 10  $\mu$ M elisidepsinnel 30 percen át, a kontroll (felső sor) és kezelt sejtek (alsó sor) képeit konfokális mikroszkóppal vettük fel. Vonás=10  $\mu$ m.

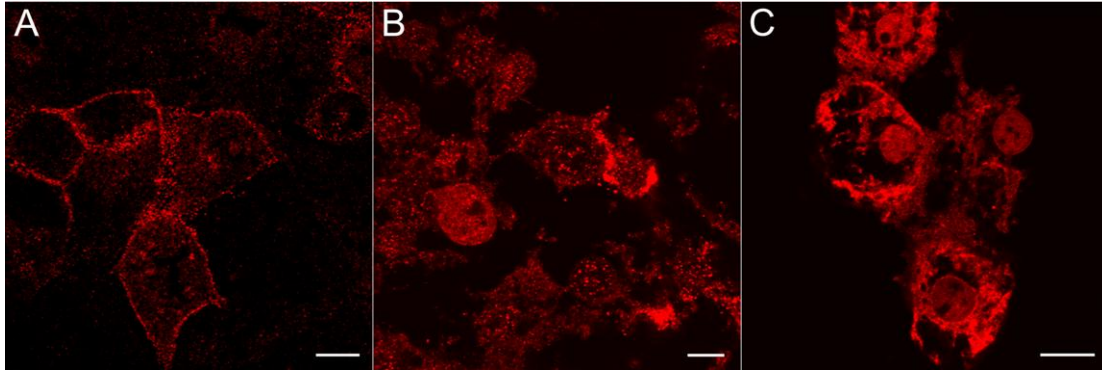
**A, E:** Kontroll (A) és elisidepsin-kezelt (E) GPI-eGFP-vel tranziensen transzfektált A431 sejtek.

**B, F:** Kontroll (B) és elisidepsin-kezelt (F) ErbB1-eGFP-vel stabilan transzfektált A431 sejtek (A4erbB1 sejtek).

**C, G:** Kontroll (C) és elisidepsin-kezelt (G) ErbB2-mYFP-vel stabilan transzfektált A431 sejtek (A4erbB2 sejtek).

**D, H:** Kontroll (D) és elisidepsin-kezelt (H) ErbB3-citrine-nel stabilan transzfektált A431 sejtek (A4erbB3 sejtek).

Hogy kizárjuk annak a lehetőségét, hogy GPI-horgonyzott eGFP nem az endogén GPI-horgonyzott proteinek fiziológiás disztribúcióját mutatja, kísérletünket megismételtük egy endogén GPI-horgonyzott fehérje (placental alkaline phosphatase; PLAP) immunfluoreszcens jelölésével A431 sejteken. A kezeletlen sejtek esetében a PLAP főleg a membránba lokalizálódott, ami kezelés hatására egy karakterisztikus vezikuláris és diffúz citoplazmatikus eloszlás keverékére jellemző mintázatra változott (23. ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az elisidepsin szelektíven indukálja a GPI-horgonyzott fehérjék és az ErbB3 plazmamembránból történő átrendeződését.



**23. ábra: A PLAP eloszlása kontroll és elisidepsin-kezelt A431 sejtekben**

Kontroll (A) és elisidepsin-kezelt (10  $\mu$ M, 30 perc; B-C) A431 sejteket fixáltunk, permeabilizáltunk és PLAP ellenes monoklonáris antitesttel jelöltünk. A proteinek disztribúciójának megjelenítését AlexaFluor647 festékkal konjugált GAMIG másodlagos antitest jelöléssel valósítottuk meg. Vonás=10  $\mu$ m.

Bár a nagy intracelluláris vezikulumok elisidepsin által kiváltott képződését és ezen vezikulumok magba történő transzportját már leírták [69], mi nem tapasztaltuk internalizációt minden vizsgált fehérje esetében. Ugyan az elisidepsin internalizációra vonatkozó szelektivitási profilját nem tudjuk megmagyarázni, de azt feltételezzük, hogy a hatóanyag által kiváltott membránhatások (amelyek magukba foglalják a lipid tutajokat is) vezetnek a lipid tutaj asszociált membrán-proteinek specifikus átrendeződéséhez, mint például a GPI-horgonyzott fehérje vagy az ErbB3 [97].

**5.1.5. Az elisidepsin a plazmamenbrán rendezettségében okoz változást**

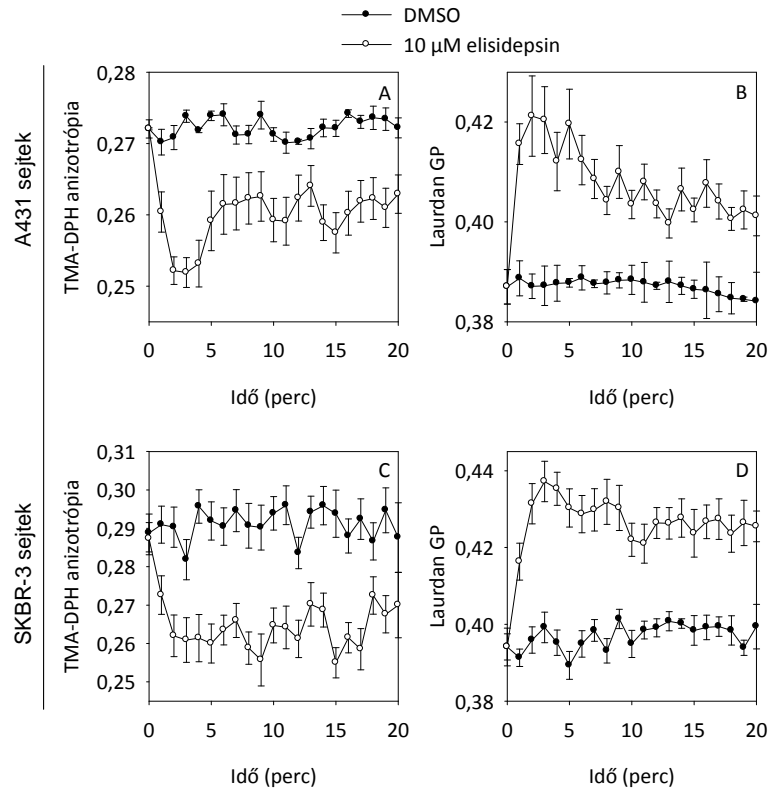
Az a megfigyelés, hogy az elisidepsin hatással van az ErbB fehérjék kölcsönhatására és disztribúciójára, ellentmondásban van azzal, hogy az ErbB proteinek expressziója nem befolyásolja a drog iránti érzékenységüket. Megkíséreltük ezt a látszólagos ellentmondást feloldani azzal, hogy feltételeztük, hogy az elisidepsin által az ErbB fehérjék eloszlásában indukált változások, amelyeket nemcsak mi, de mások is megfigyeltek, egy korábban jelentkező membránátrendeződés következményei. Számtalan olyan gyógyszer, amelynek támadáspontja a sejtmembrán, a lipid kettősréteg fluiditásában és rendezettségében okoz változásokat [121-123]. Annak ellenőrzésére, hogy az elisidepsin indukál-e hasonló hatásokat, kétféle fluoreszcens próbát használtunk. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája a plazmamembrán mikroviszkozitásának (fluiditásának) érzékeny indikátora, mivel pozitív töltése miatt nem tud átmenni a sejtmembránon és belépni az intracelluláris organelumok membránjába [108, 109, 124]. A431 sejtek kezelése 10  $\mu$ M elisidepsinnel egy majdnem azonnali csökkenést idézett elő a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájában, ami

megnövekedett membránfluiditást jelent. Ezt követően az anizotrópia fokozatosan, de nem teljesen visszaemelkedett a kezdeti értékre ~20 perc alatt (**24. ábra**).

A Laurdan generalizált polarizációja (GP) érzékeny a plazmamembrán rendezettségére és a vízmolekulák membránba való penetrációjának mértékére [109-111]. A Laurdan GP-ja a kezelést követően 1 percen belül megnövekedett, a csúcs ~2 percnél volt, majd fokozatosan csökkent, de a kiindulási értéket nem érte el (**24. ábra**). Az elisidepsin oldószere (DMSO) nem okozott jelentős változást sem a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájában, sem a Laurdan GP értékében.

A megnövekedett GP érték a plazmamembrán rendezettségének növekedésére és a víz penetrációjának csökkenésére utal. A fluoreszcencia anizotrópia csökkenésének és a GP növekedésének kombinációja arra utal, hogy olyan membrán domének indukálódtak, melyekben kicsi a molekulák hidratáltsági szintje, de viszonylag nagy a mobilitása. Ez a rendezett folyékony doménekre („liquid ordered domain”) jellemző, amelyek a lipid tutajok megfelelői. [109, 125]. Feltételezzük, hogy a membrán szerkezetében beálló ezen jelentős változásokat követi a membrán permeabilizáció („membrán-károsodás”) és a sejt pusztulása. Elisidepsin-indukált lipid rendezettség növekedést nemrégiben mások is publikáltak [77].

Ahhoz hogy bizonyítsuk, hogy az elisidepsin által megfigyelt membránváltozások nem csak az A431 sejtek esetében jelentkeznek, kísérleteinket SKBR-3 sejtvonalon is megismételtük. Az SKBR-3 sejtek nagyobb érzékenységet mutatnak a drog iránt ( $IC_{50}$ :  $1,5 \pm 0,2 \mu M$ , be nem mutatott eredmény). Az elisidepsin által a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiában és a Laurdan GP értékekben az SKBR-3 sejteken indukált változások tendenciája nagy hasonlóságot mutatott az A431 sejteknél tapasztaltakhoz (**24. ábra**). Az elisidepsin által kiváltott hatások mértéke még magasabbnak is mutatkozott az SKBR-3 sejtek esetében és a változás is kevésbé volt tranziens. Ez összefüggésben lehet az elisidepsin alacsonyabb  $IC_{50}$  értékével SKBR-3 sejteken.



**24. ábra: Elisidepsin-indukált változások az A431 és az SKBR-3 sejtek plazmamembrán rendezettségében**

A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájának (A, C) és a Laurdan generalizált polarizációjának (B, D) változása 10 μM elisidepsinnel, valamint a megfelelő térfogatú DMSO-val kezelt A431 és SKBR-3 sejteken. Az ábrán három különböző mérés átlagát és annak hibáját ( $\pm$ SEM) tüntettük fel.

A lipid kettősréteg rendezettségében és fluiditásában tapasztalt gyors változások alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy az elisidepsin elsődleges támadáspontja a plazmamembrán. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájának és a Laurdan generalizált polarizációjának azonnali változása a sejthalál és a membránpermeabilizáció előzménye, amit néhány perc után a PI felvétel is bizonyít. A drog által kiváltott membránhatások igen gyorsak, de a membrán-proteinek (GPI-horgonyzott- és ErbB proteinek) asszociációjában és eloszlásában tapasztalt változások időigényesebbek. Ezért is feltételezzük, hogy az ErbB- és GPI-horgonyzott proteinek eloszlása és asszociációja az elisidepsin által a sejtmembránon kiváltott strukturális változásoknak a következménye.

A rákos sejtek sokkal érzékenyebbek a Kahalalide F és az elisidepsin iránt, mint a nem-tumoros sejtek [73, 74] és ez a felfedezés látszólag ellentmondásban van az elisidepsin membránra gyakorolt nem-specifikus hatásával. Ugyanakkor ismert, hogy a tumorsejtek karakterisztikus változásokat mutatnak a zsírsav és gangliozid összetételükben. Többek között

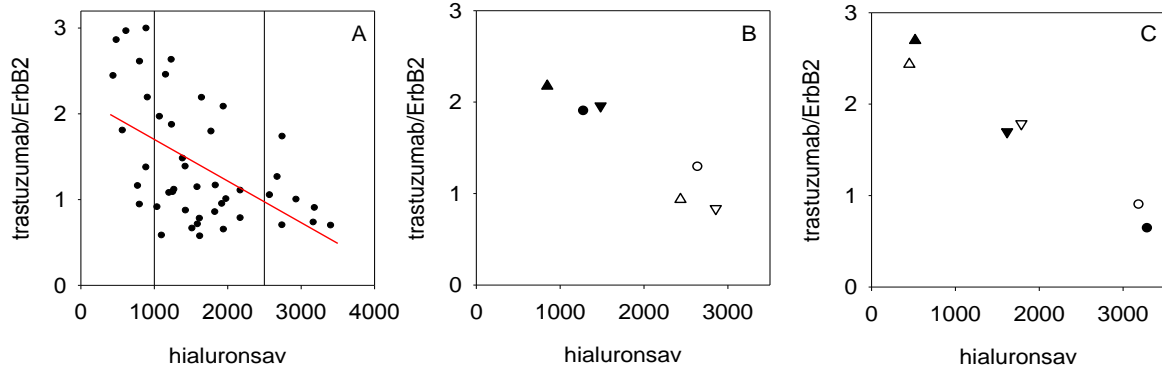
növekedést figyeltek meg a telített/telítetlen zsírsavak arányában és a kevésbé komplex gangliozidok felhalmozódásában [126-128]. Emellett az FA2H (fatty acid 2-hydroxylase) fokozott kifejeződését malignus tumorokban már leírták. Mivel a FA2H feltételezhetően szükséges a sejtek elisidepsin iránti érzékenységéhez, így várható, hogy a nagyobb mennyiségű FA2H-t kifejező daganatsejtek szelektív érzékenységet mutatnak a drogra [128, 129]. Azonban köztudott, hogy a tumor hipoxiája csökkenti a hidroxiláció mértékét az oxigénhiánynak köszönhetően. Ez várhatóan a FA2H által katalizált hidroxiláció mértékét is csökkenteni fogja, ami az elisidepsin tumor specificitása ellen hat [128]. Hogy a tumor hipoxia valóban befolyásolja-e a rákos sejtek elisidepsin szenzitivitását, még egyelőre kérdéses.

Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy az elisidepsin érzékenység és az ErbB1-3 expressziós szintjének antikorrelációja megkérdőjelezi az ErbB proteinek fontosságát az elisidepsin iránti fogékonyságban. Továbbá, egyértelműen bizonyítottuk, hogy az ErbB- és a GPI-horgonyzott proteinek eloszlásában és asszociációjában tapasztalt változások másodlagos hatások, ami az elisidepsin-indukált membrán változásoknak köszönhető. Azonban további vizsgálatok szükségesek annak magyarázatára, hogyan függ a drog iránti érzékenység a strukturális és dinamikus sejtmembrán változásoktól.

## ***5.2. Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban***

### **5.2.1. A páciensekben a trastuzumab kötődését a magas hialuronsav képződés meggátolja**

Kifejlesztettünk egy módszert a trastuzumab kötődésének kvantitatív meghatározására, amit a humán emlődaganatos szövetek ErbB2 expressziójára normáltunk. A metszeteket háromszorosan jelöltük: a HA expressziót HABC jelöléssel mértük, az ErbB2 kvantitatív meghatározásához egy olyan monoklonális antitestet használtunk, ami az ErbB2 intracelluláris epitópját ismeri fel (mAb OP15), míg a harmadik fluoreszcens antitest a trastuzumab volt. Azonosítottuk a sejtmembránt és a trastuzumab intenzitását normáltuk az ErbB2 expressziós szintjére. A fluoreszcencia intenzitásokat csak a membrán pixelek által alkotott maszkhoz tartozó területen határoztuk meg. A HA sejtek körüli sűrűségét is meghatároztuk a membrán maszkban és az átlag ErbB2-normalizált trastuzumab kötődést (a pixelenként számolt trastuzumab/OP15 arányok átlaga) ábrázoltuk a HA sűrűségének függvényében. Minden esetben meghatároztuk ezeket az átlagokat, betegenként ~4 metszetről ~4 képet vettünk fel (**25, 26. ábra**).



**25. ábra: A szövetek magas hialuronsav sűrűsége alacsony trastuzumab kötődésre utal**

**A:** A metszeteket jelöltük trastuzumabbal (direkt jelölés AlexaFluor546-tal), egy ErbB2 elleni antitesttel (OP15, indirekt jelölés AlexaFluor647-GAMIG), ami az ErbB2 intracelluláris doménjéhez kötődik, a hialuronsavat pedig HABC segítségével (indirekt jelölés AlexaFluor488-streptavidinnel). A HA sűrűséget és a trastuzumab/OP15 intenzitás arányokat a membrán maszkban számoltuk ki (lásd 26. ábra). Ezeket a paramétereket átlagoltuk minden beteg esetén, ezért minden egyes pont az ábrán egy-egy beteg átlag értékeit mutatja. A piros vonalat lineáris regresszióval illesztettük az adott pontokra ( $r = -0.52$ ). A vertikális referencia vonalak azt mutatják, hogyan osztottuk a kapott pontokat három csoportra (alacsony, közepes és magas HA sűrűség) a további statisztikai analízishez.

**B:** A hialuronidáz kezelés hatásának demonstrálására kiválasztottuk azon betegek mintáit, amelyek nagy hialuronsav mennyiséget mutattak. Hat darab metszetet vettünk ki ebből a csoportból, melyek közül hármat emésztettünk hialuronidázzal (teli szimbólumok), míg a másik három kezeletlen kontrollként szolgált (üres szimbólumok). A jelölés az "A" részben leírtak szerint történt, majd meghatároztuk a trastuzumab/Erbb2 arányt, valamint a hialuronsav tartalom átlagát minden beteg esetében. Az azonos alakú szimbólumok azonos pácienseket jelentenek.

**C:** Három metszetet választottunk ki a 3 különböző csoportból és megjelöltük őket az "A" részben leírtak szerint, de a fluoreszcens festékeket a trastuzumab és OP15 esetében felcseréltük, vagyis a trastuzumab közvetlenül volt jelölve AlexaFluor647-tel, míg az OP15 indirekten AlexaFluor546-GAMIG-gal (a tele szimbólumok "fordított" jelölést jelentenek). Az üres szimbólumok jelentik a három minta normál jelölésének eredményeit, aminek folyamatát az "A" részben már tárgyaltam ("normál" jelölés). A HABC, trastuzumab és OP15 képek fluoreszcencia intenzitását mértük a fordítottan jelölt mintáknál és normáltuk a megfelelő fluoreszcencia intenzitásokkal, amit a normál jelölés során kaptunk. Az azonos alakú, de üres vagy tele szimbólumok azonos mintáknak felelnek meg, csak a két különböző protokoll szerint lettek megjelölve.

A normalizált trastuzumab kötődés jelentős negatív korrelációt mutatott a HA mennyiségével. A korrelációs koefficiens  $-0,52$  volt (95% konfidencia intervallum  $-0,88$  és  $-0,27$  között, amit a korrelációs koefficiens Fisher-féle Z-transzformációjával határoztunk meg). Ez az érték szignifikánsan eltér nullától, és egy közepesen erős kapcsolatra utal a két változó között. A korrelációs koefficiens négyzete  $0,27$ , ami arra utal, hogy közelítően a normalizált trastuzumab kötődésének varianciájának negyedéért a HA sűrűsége a felelős [130]. A

mintákat három csoportra osztottuk (alacsony, közepes és magas HA sűrűség) a vertikális referencia vonal alapján, lásd **25.A. ábra**. A variancia analízis szignifikáns különbséget mutatott a normalizált trastuzumab kötődésénél a három csoport esetében ( $p < 0,001$ , **VI. táblázat**), ugyanis a trastuzumab kötődése kétszer magasabb volt az alacsony HA mennyiségnél, mint a magasnál. Tukey's HSD teszt megerősítette, hogy a normalizált trastuzumab kötődés a közepes és a magas HA csoportoknál különböző volt az alacsony HA mintákhoz képest ( $p = 0,001$ ).

Hialuronsav sűrűség <sup>a</sup>	Normalizált trastuzumab kötődés <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>
alacsony (730±175)	2,13±0,77	
közepes (1565±340)	1,25±0,59	0,001
magas (2940±295)	1±0,35	0,001

<sup>a</sup>A mintákat 3 csoportra osztottuk HA mennyiségük alapján, amit a 17. A. ábrán látható vertikális referencia vonalak is mutatnak. A feltüntetett számok az átlagot mutatják±S.D.

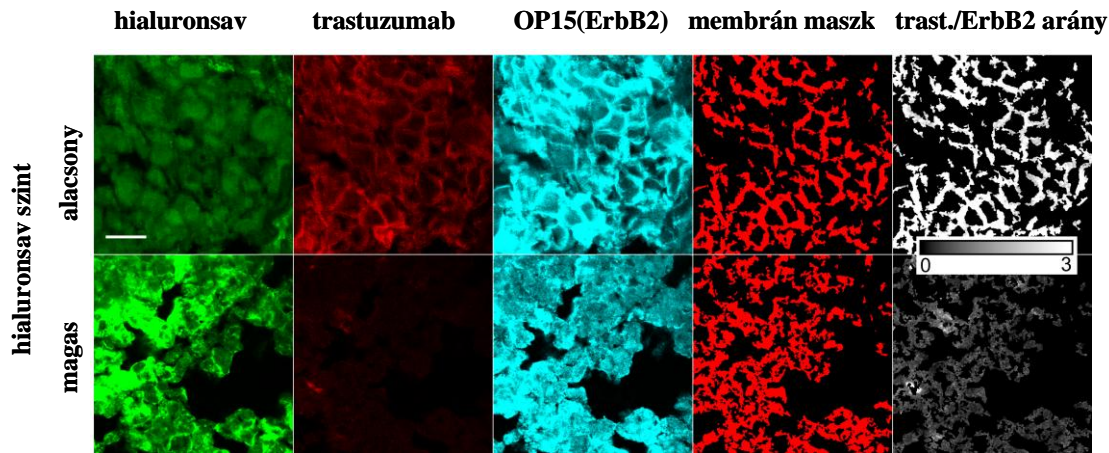
<sup>b</sup>A normalizált trastuzumab kötődést úgy számoltuk, hogy vettük a pixelenkénti trastuzumab/OP15 intenzitás arányok átlagát. A feltüntetett számok az átlagot mutatják±S.D.

<sup>c</sup>A Tukey's HSD teszt p-értékei a közepes és magas HA csoportok trastuzumab kötődését az alacsony HA-t tartalmazó csoporttal való összehasonlítás során.

---

**VI. táblázat: A normalizált trastuzumab kötődését a sejtkörüli hialuronsav mennyisége szignifikánsan befolyásolja**

A hatás nagyságát (a normalizált trastuzumab kötődés variabilitásának összehasonlítása a mért hibával), amit a Cohen-féle  $f$  értékkel becsültünk meg, 0,61-nek adódott [130]. Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a sejtek körüli HA meggátolja a trastuzumab kötődését az ErbB2 receptorhoz.



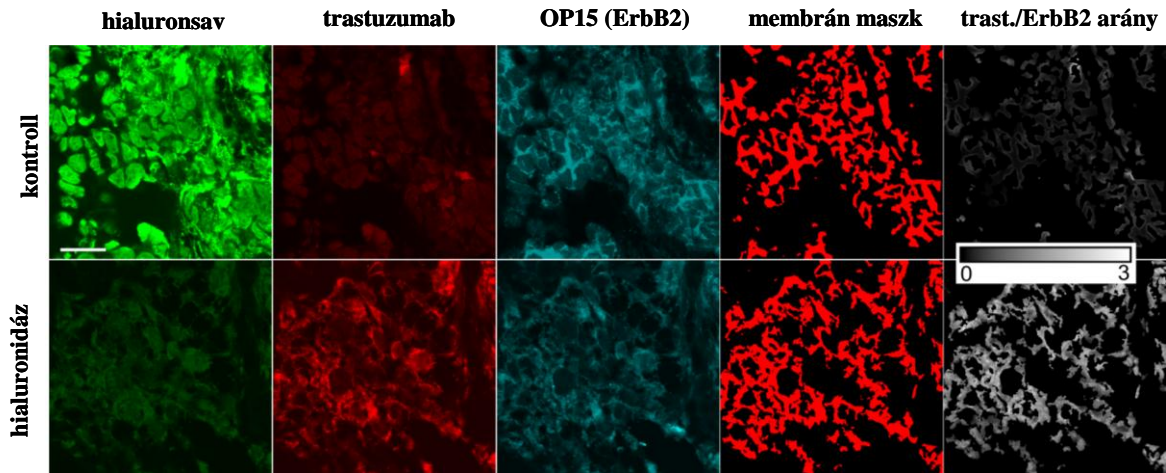
**26. ábra: Egy reprezentatív kép, ami a hialuronsav és a trastuzumab közötti antikorreláció tipikus példáját mutatja**

A mintákat a következő antitestekkel jelöltük meg: trastuzumab, OP15 és HABC. MAb OP15 az ErbB2 intracelluláris epitópjához kötődik, míg a HABC a HA-at jelöli. A membrán maszkban pirossal jelölt pixelek a sejtmembránnak felelnek meg, amelynek azonosítását az Anyagok és módszerek című részben tárgyaltam. A trastuzumab és OP15 képekből levontuk a háttérrel, majd fluoreszcencia intenzitásait elosztottuk egymással. Az így kapott trastuzumab/ErbB2 hányadost szürke skálán jelenítettük meg a jobb oldali képeken. Vonás=20  $\mu$ m, minden képre vonatkozóan.

A kapott eredmények jó egyezést mutatnak korábban *in vitro* és egér xenograftokban kapott kísérletek eredményével, ahol a HA által okozott trastuzumab kötődés gátlását demonstrálták [38]. Az antikorreláció megállapításának megbízhatósága függ a sejtmembrán ErbB2 expressziós szintjétől. Mint azt korábban említettem, az OP15 antitest nem maszkírozódik és így fluoreszcencia intenzitása jelzi az ErbB2 expressziós szintet [36].

### **5.2.2. A hialuronidáz enzimés emésztés „leleplezi” az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját**

A HA maszkírozó szerepének további bizonyítására a metszeteket hialuronidáz enzimmel kezeltük és azok HA mennyiségét és normalizált trastuzumab kötődését összehasonlítottuk az enzimmel nem emésztett párjukkal (kontroll minta). A HABC jelölődés intenzitása szignifikánsan csökkent a hialuronidáz enzimmel kezelt minták esetében. A HA sejt körüli sűrűségének csökkenése határozottan megnövelte a normalizált trastuzumab kötődését, ami arra utal, hogy a hialuronidáz emésztés hatékonyan feltárja az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját (25.B., 27. ábra). Ezen eredmények összhangban vannak a korábban részletezettekkel, és alátámasztják, hogy a HA gátolja a trastuzumab ErbB2-höz való kötődését humán emlőtumor mintákon.



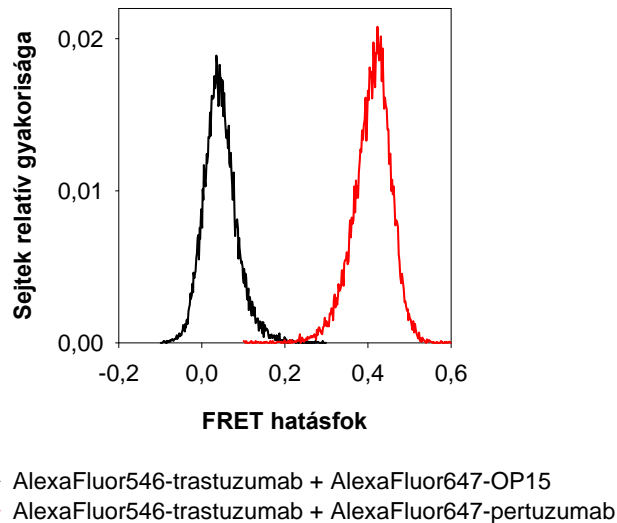
**27. ábra: Reprezentatív kép a hialuronidáz emésztés trastuzumab kötődésre kifejtett hatásának bemutatására**

A mintákat hialuronidázzal kezeltük és ugyanazon páciensek kezeletlen mintáját pedig kontrollnak tekintettük. A mintákat a következő antitestekkel jelöltük meg: trastuzumab, OP15 és HABC. MAb OP15 az ErbB2 intracelluláris epitópjához kötődik, míg a HABC a HA-at jelöli. A membrán maszkban pirossal jelölt pixelek a sejtmembránnak felelnek meg, amelynek azonosítását az Anyagok és módszerek című részben tárgyaltam. A trastuzumab és OP15 képekből levontuk a háttérrel, majd fluoreszcencia intenzitásait elosztottuk egymással. Az így kapott trastuzumab/ErbB2 hányadost szürke skálán jelenítettük meg a jobb oldali képeken. Vonás=20  $\mu$ m, minden képre vonatkozóan.

### 5.2.3. A FRET nem okozza a trastuzumab kötődés és a hialuronsav sűrűsége közötti negatív korrelációt

Számos faktor generálhatja a negatív korrelációt a két fluoreszcens próba kötődése között. Az AlexaFluor488-kapcsolt HABC AlexaFluor546-trastuzumab általi FRET-indukált kioltása is vezethet a HABC fluoreszcencia intenzitás csökkenéséhez magas trastuzumab kötődés esetében. Másrészt az AlexaFluor546-trastuzumab fluoreszcencia kioltása AlexaFluor647 jelölt OP15 által ugyancsak a trastuzumab/OP15 fluoreszcencia intenzitás arány csökkenéséhez vezethet. Ha a fenti faktorok bármelyike hatással lenne a megfigyelt negatív korrelációra, akkor a trastuzumab és OP15 antitestek fluoreszcens festékeinek felcserélése a korreláció megváltozásához vezetne. Ezért kiválasztottunk egy-egy mintát az alacsony, közepes és magas HA mutató csoportokból és összehasonlítottuk azok trastuzumab/ErbB2 arányait, amikor megjelöltük őket AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-OP15 antitestekkel (“normál” jelölés), valamint AlexaFluor546-OP15 és AlexaFluor647-trastuzumab antitestekkel (“fordított” jelölés). Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a trastuzumab/ErbB2 arányok tendenciájában a kétféle jelölés során (**25.C. ábra**). Továbbá, vizsgáltuk a FRET hatását az AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-

OP15 antitestek között áramlási citometriás méréssel SKBR-3 emlő tumor sejteken. A FRET szinte teljes hiányát figyeltük meg a két epitóp között, ami összhangban van a két antitest közötti nagy távolsággal, ugyanis ezek az antitestek ellentétes doménekhez kapcsolódnak, az egyik az ErbB2 intracelluláris, a másik az extracelluláris részéhez és ez bizonyítja, hogy a FRET jelenségnek nincs hatása a normalizált trastuzumab kötődésre (28. ábra).



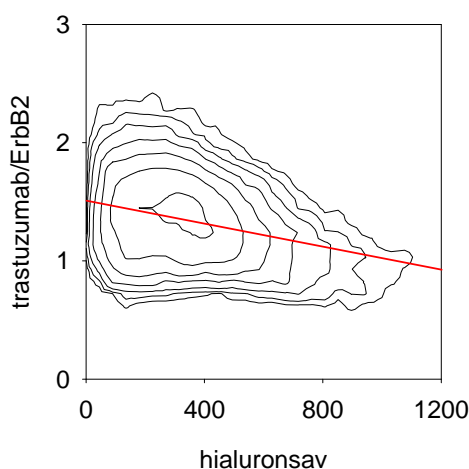
**28. ábra: Intramolekuláris FRET mérés az ErbB2 epitópjai között: a trastuzumab és az OP15 FRET távolságon kívül vannak egymástól**

SKBR-3 sejteket jelöltünk AlexaFluor546-trastuzumab és OP15 antitestekkel, amelyet másodlagosan AlexaFluor647-GAMIG-vel festettünk meg (fekete görbe). Pozitív kontrollként a sejteket AlexaFluor546-trastuzumab és AlexaFluor647-pertuzumab antitestek keverékével jelöltük meg, hogy a két epitóp közötti erős intramolekuláris FRET-et mérni tudjuk (piros görbe). A sejteket (20.000/minta) áramlási citométeren mértük és a FRET hatásfokot sejtenkénti eljárásban értékeltük ki. 0,04-es FRET értéket kaptunk a trastuzumab-OP15 donor-akceptor párra (pozitív kontrollnál a 0,4 érték erős FRET-re utal), vagyis FRET jelenség nem léphet fel a trastuzumab extracelluláris és az OP15 intracelluláris epitópjai között.

Kizártuk a spektrális átfedés lehetőségét is a trastuzumab kötődés és a HA sűrűség között megfigyelt negatív korrelációra, mivel a spektrális átvilágítás jelentéktelen a fluoreszcens csatornák között. Következésképpen, elmondhatjuk, hogy az általunk tapasztalt negatív korreláció a fluoreszcens intenzitások között tükrözi a fluoreszcens próbák közötti negatív korrelációt és kizárhatjuk a spektrális átfedés és a FRET lehetőségét a megfigyelt antikorrrelációra.

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

A fentebb említett megfigyelést, miszerint az alacsony trastuzumab kötődés a magas HA tartalomnak köszönhető, egyedi minták alapján is bizonyítottuk. Vizsgáltuk a korrelációt a kétdimenziós hisztogrammok (kontúr ábra) ellenőrzésével, ahol a normalizált trastuzumab kötődést ábrázoltuk a HA sűrűség függvényében. A negatív korreláció a minták  $\sim 2/3$ -ánál megfigyelhető volt. Egy tipikus példa látható a **29. ábrán**.



**29. ábra:** A hialuronsav és a trastuzumab kötődés közötti antikorrreláció példája egyetlen konfokális kép esetén

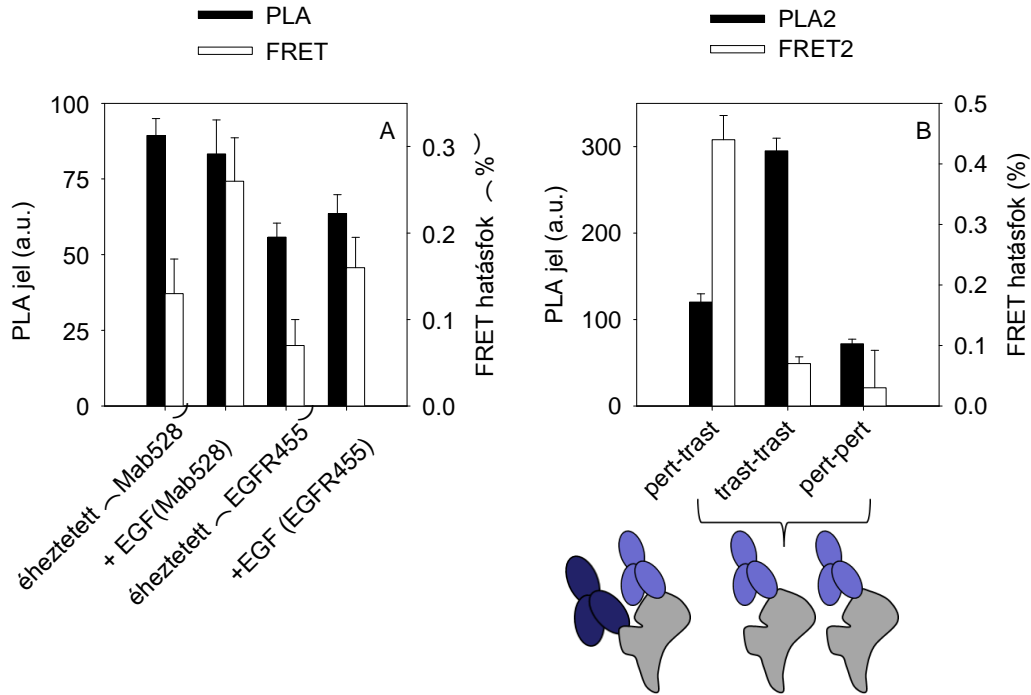
A metszetet megjelöltük trastuzumabbal, OP15-el és HABC-al. A trastuzumab/ErbB2 arányt és a HA sűrűséget a membrán maszkban határoztuk meg, mint ahogy azt a **25, 26. ábrák** leírásánál említettem. A piros trend vonal a trastuzumab/ErbB2 arány és a HA sűrűség közötti lineáris regressziós egyenest mutatja ( $r = -0.3$ ).

A hatás nagysága szignifikánsan alacsonyabb volt (Cohen-féle  $f = 0.31$ ) ebben az esetben, mint páciensenként, a korrelációs koefficiens is alacsonyabbnak mutatkozott ( $r = -0.3$ ) és csak  $\sim 1.5$ -szeres különbség volt a normalizált pixelenkénti átlag trastuzumab kötődésben az alacsony és a magas HA sűrűségeknel (szemben a betegenként számolt adatoknál kapott  $\sim 2.5$ -szeres különbséggel). Ezen adatok mégis megerősítik, hogy a sejt körüli HA megakadályozza a trastuzumab ErbB2-höz történő kötődését.

### **5.3. A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata**

#### **5.3.1. Kezdeti észrevételek a FRET és a PLA közötti korreláció hiányáról**

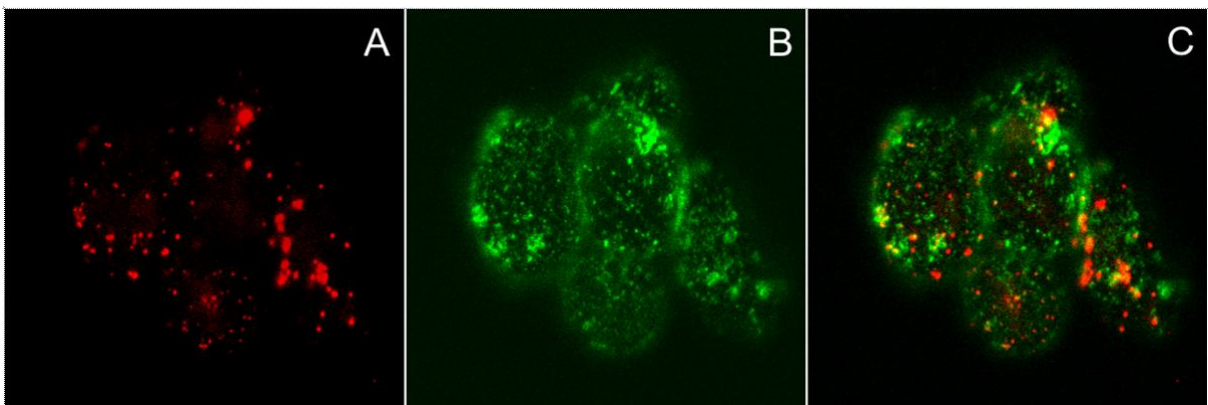
Mivel metszetekben a FRET és a hozzá hasonló mérések kivitelezése nehézségekbe ütközik, a PLA módszer értékes alternatívát kínál ilyen esetekben. Bár a PLA módszer kidolgozói a módszer kvantitatív jellege mellett érveltek, erre vonatkozó kísérletes bizonyítékok nem láttak napvilágot. Ezért célul tűztük ki, hogy a FRET és PLA módszereket olyan esetekben hasonlítsuk össze, amikor saját és mások kísérletes eredményei alapján tudjuk, hogy a vizsgált fehérjék milyen mértékben asszociálnak. Az első ilyen rendszer az ErbB1 receptor homodimerizációjának EGF indukálta növekedése volt. Míg az ErbB1 homoklaszterek növekedése a várakozással összhangban szignifikáns volt EGF kezelés után áramlási citometriás FRET mérések alapján, addig a PLA esetében nem tapasztaltunk változást a receptorok homoasszociációjában a növekedési faktor hatására (**30.A. ábra**). Ezt követően a FRET és a PLA eredmények korrelációját az ErbB2 molekulán végrehajtott inter- és intramolekuláris mérések során vizsgáltuk. A sejteket megjelöltük olyan donor- és akceptor-konjugált ErbB2 ellenes antitestekkel, amelyek az ErbB2 különböző epitópjai ellen termeltettek, és mértük az intramolekuláris FRET-et. Majd az ErbB2 homoasszociációjának mérése céljából a sejteket az ErbB2 ugyanazon epitópja elleni, donor-konjugált és akceptor-konjugált anti-ErbB2 antitestek keverékével jelöltük meg. A FRET és PLA kísérletek eredményei között nem tapasztaltunk korrelációt (**30.B. ábra**). A méréseket áramlási citométeren végeztük, de a sejtek PLA és immunfluoreszcens jelét ellenőriztük fluoreszcens mikroszkóppal is. Amint azt a reprezentatív képek is mutatják az immunfluoreszcens jelölődés eloszlása és a PLA jel a publikált adatokkal jó egyezést mutat (**31. ábra**). Mivel a FRET kvantitatív jellegéről már számtalan elméleti és kísérleti elemzés született, fel kellett tételeznünk, hogy a PLA módszer ebben a tekintetben jelentősen elmarad a FRET mögött. A továbbiakban ezen feltételezésünk ellenőrzésére végeztünk szisztematikus vizsgálatokat.



**30. ábra: A PLA és a FRET mérések közötti eltérés**

**A:** Éheztetett A431 sejteket jelöltünk donor- és akceptor-konjugált Mab528 vagy EGFR455 antitest keverékkel. Mindkét antitest az ErbB1 extracelluláris epitópját ismeri fel, de az Mab528 verseng az EGF kötődéssel, míg az EGFR455 nem. A FRET hatékonyságot áramlási citométerrel mértük nyugvó és EGF-stimulált sejteken (fehér oszlop). Párhuzamosan, kontroll és stimulált A431 sejteket jelöltünk Mab528-„priming” és Mab528-„non-priming” vagy EGFR455-„priming” és EGFR455-„non-priming” antitest keverékkel és a PLA jelet áramlási citométerrel mértük (fekete oszlop).

**B:** SKBR-3 sejteket jelöltünk a feltüntetett elsődleges fluorofór- vagy oligo-kapcsolt antitest keverékekkel. „trast” és „pert” a trastuzumab és pertuzumab antitestek rövidítése. Az első antitestet donor vagy „priming” oligonukleotiddal jelöltük, míg a másodikat akceptor vagy „non-priming” oligonukleotiddal. A PLA jelet (fekete oszlop) és a FRET jelet (fehér oszlop) különböző mintákon mértük. Az oszlopdiaagramokon a hibajelek a középérték közepes hibáját jelentik.

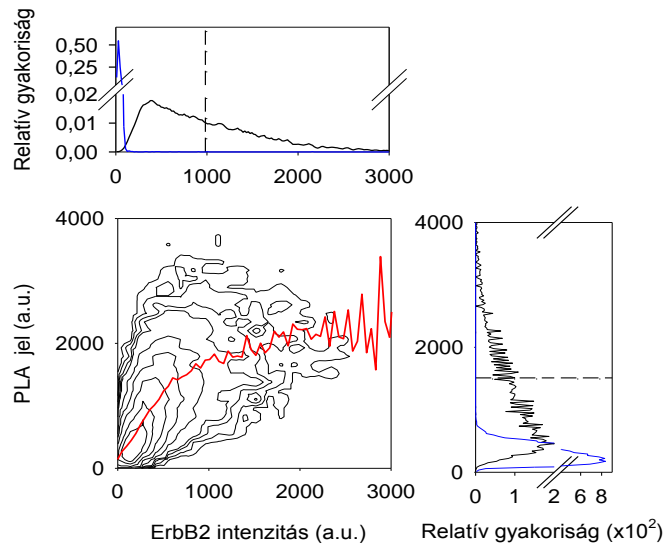


**31. ábra: Reprezentatív mikroszkópos kép a PLA kísérletekhez megjelölt sejtekről**

SKBR-3 emlőtumor sejteket jelöltünk trastuzumab-„priming”, pertuzumab-„non-priming” és AlexaFluor488-7C2 ErbB2 ellenes antitestekkel. A PLA jelet Cy5-jelölt detektáló oligonukleotiddal vizualizáltuk (A). Az immunfluoreszcens képet az AlexaFluor488-7C2-ről és az egymásra helyezett képet a B és C ábrákon mutatjuk be.

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

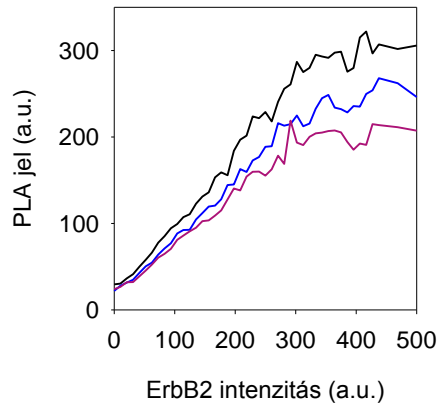
A két módszer szisztematikus összehasonlítását a homoasszociáció expressziós szinttől való függésének elemzésével kezdtük. Összehasonlítottuk a FRET és a PLA mértékének függését a fluorofór-kapcsolt és az oligonukleotid-konjugált antitestek mennyiségétől. SKBR-3 sejteket jelöltünk trastuzumab-„priming” és trastuzumab-„non-priming” antitestek keverékével az ErbB2 homoasszociációjának vizsgálatához PLA felhasználásával. Ugyanazon sejteket ErbB2 ellenes fluoreszcens antitesttel is jelöltük a fehérje expresszió mértékének méréséhez. A kontúr ábrán és a trend vonalon megfigyelhetjük, hogy a PLA jel telítésbe fut magas, de nem extrém ErbB2 expressziós szint esetén (**32. ábra**).



**32. ábra: Áramlási citométerrel mért PLA jel telítődése az ErbB2 magas expressziós szintjénél**

SKBR-3 sejteket jelöltünk trastuzumab-„priming” és trastuzumab-„non-priming” antitestek keverékével, hogy az ErbB2 homoasszociációját mérjük PLA segítségével. A PLA jelet Cy5-jelölt detektáló oligonukleotiddal mértük. A sejteket AlexaFluor488-7C2 antitesttel is megjelöltük az ErbB2 expressziós szintjének vizsgálatához. A piros trend vonal jelzi a PLA jel átlagát az ErbB2 expressziós szintjének függvényében. A kontúr szinteket logaritmikusan definiáltuk, de a kontúr ábra mellett és felett látható hisztogramok mutatják a fluoreszcencia intenzitás valódi eloszlását. A fekete hisztogramok az ábra horizontális és vertikális tengelyén az AlexaFluor488-7C2 intenzitás és a PLA jel eloszlását mutatják. A szaggatott referencia vonal a fekete hisztogramok átlagánál helyezkedik el. A felső ábrán levő kék hisztogram a nem jelölt sejtek AlexaFluor488-as csatornában mérhető fluoreszcencia intenzitását mutatja, a jobb oldali ábrán pedig a negatív kontroll minta PLA jelét láthatjuk, amit csak trastuzumab-„priming” antitesttel jelöltünk meg.

A tény, hogy a PLA szignál telítődése a fluoreszcencia intenzitás eloszlás középső részén van (vagyis körülbelül az átlag fluoreszcencia intenzitásánál), utal arra, hogy a telítési effektus a PLA kísérleteknél a tumor sejteknél gyakran megfigyelhető magas expressziós szinteknél bekövetkezik. A PLA jel telítődési tendenciáját három különböző „priming” és „non-priming” oligonukleotiddal jelölt antitest arányánál is megfigyeltük (1:3, 1:1, 3:1) (**33. ábra**).

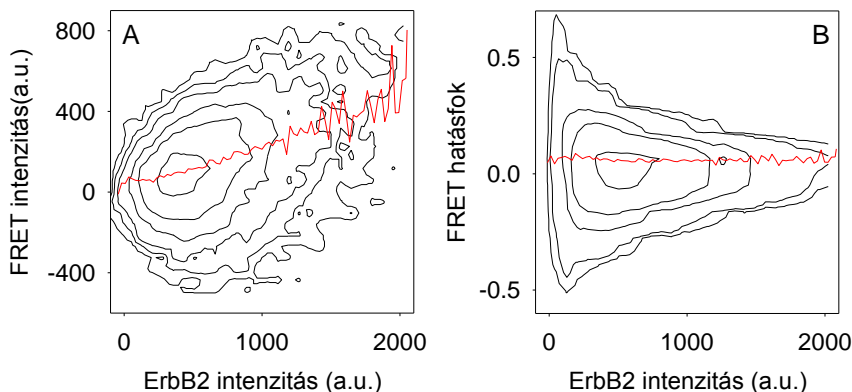


**33. ábra: A szaturáció jelensége a PLA-nál független a „priming” és „non-priming” oligonukleotidok arányától**

SKBR-3 emlőtumor sejteket jelöltünk pertuzumab-„priming”, pertuzumab-„non-priming” és AlexaFluor488-7C2 ErbB2-ellenes antitestekkel. A „priming” és „non-priming” antitestek aránya a következő volt: 3:1 (fekete vonal); 1:1 (kék vonal); 1:3 (piros vonal) a három különböző mérés során. A PLA jelét a Cy5-jelölt detektáló oligonukleotid segítségével mértük áramlási citométeren. Az AlexaFluor488-7C2 antitest fluoreszcencia intenzitását használtuk az ErbB2 expressziós szintjének méréséhez. Az ábrán az átlag PLA jelet az ErbB2 intenzitás függvényében ábrázoltuk.

A PLA jel telítési effektusának kísérletes igazolása után ugyanazon biológiai rendszeren ellenőriztük, hogy a FRET jel mutat-e hasonló tendenciát. A FRET intenzitás, amit a (10)-es képletből számoltunk ki, nem telítődött és a trend vonal lineáris függést mutat a FRET intenzitás és az ErbB2 expressziós szintje között még magas fluoreszcencia intenzitásnál is (**34.A. ábra**). Mivel a FRET intenzitás függ mind a fluorofór-jelölt antitestek mennyiségétől ( $I_d$ ), mind azok közelségétől ( $E$ ), így analóg a PLA jellel, amelynél szintén várható, hogy a fehérjék proximitásától és mennyiségétől egyaránt függ. A tény, hogy a FRET intenzitás és a PLA jel különbözőképpen függött a vizsgált proteinek expressziós szintjétől, azt sugallja, hogy ez a két módszer jelentősen különböző információt szolgáltat a fehérje asszociációkról. Ezt követően meghatároztuk a FRET hatásfok függését az ErbB2 expressziós szintjétől. A FRET hatásfok a proteinek asszociációjának mértékét jellemzi, és a protein expressziótól csak

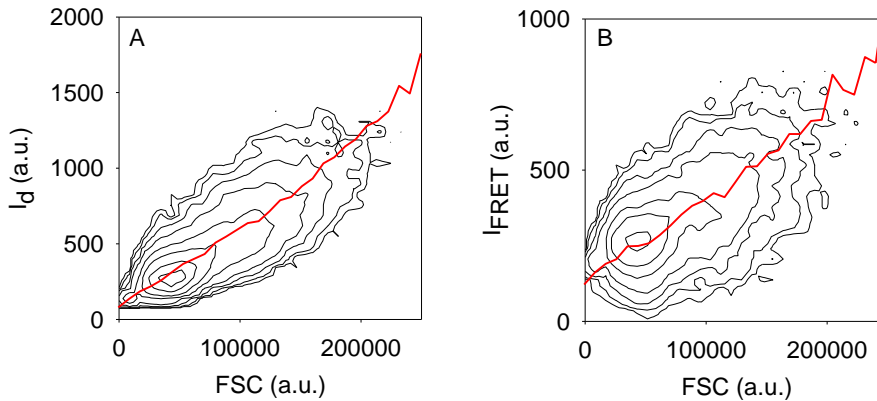
annyiban függ, amennyiben az a protein asszociációkat befolyásolja. Ellentétben a FRET intenzitással, a FRET hatékonyság független volt a fluoreszcencia intenzitástól (**34.B. ábra**).



**34. ábra: A FRET lineárisan függ az ErbB2 expressziós szinttől még magas fluoreszcencia intenzitásoknál is**

SKBR-3 sejteket jelöltünk donor-jelölt és akceptor-jelölt trastuzumab antitest keverékkel az ErbB2 homoasszociációjának áramlási citométeres FRET méréséhez. Kiszámítottuk a ki nem oltott donor fluoreszcencia intenzitást (ErbB2 intenzitás a vízszintes tengelyen), ami a proteinek celluláris expressziós szintjét reprezentálja. A FRET intenzitás és a FRET hatásfok az ErbB2 homoasszociációjának mértéke. A kontúr szintek a kétdimenziós hisztogramon logaritmikusan voltak definiálva. A piros trend vonalak mutatják az átlag FRET intenzitást vagy FRET hatékonyságot az ErbB2 expressziós szintjének függvényében.

Habár ez a kapcsolat elméletileg lehetséges [117], ellentétben van korábbi eredményeinkkel, miszerint az ErbB2 pixelenkénti homoasszociációja arányos a fehérje lokális sűrűségével mikroszkópos FRET mérésekben a tömeghatás törvényével összhangban [97]. Emiatt megvizsgáltuk az ErbB2 expressziós szintje és a sejtméret közötti korrelációt. A sejtek méretét az előre irányú fényszórással (FSC=forward scattering) becsültük meg. A ki nem oltott donor intenzitás ( $I_d$ , ErbB2 expressziójának mérése) és a FRET intenzitás arányos volt a sejtmérettel (**35. ábra**).



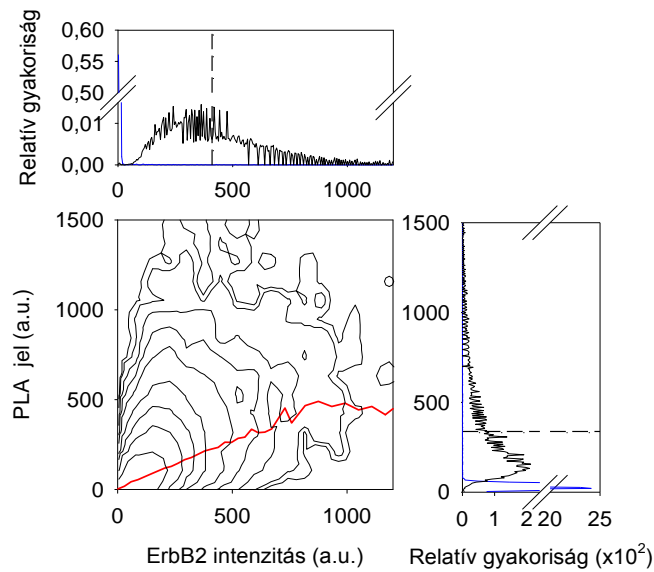
**35. ábra: A donor fluoreszcencia intenzitás arányos az előreszórással (FSC-vel)**

SKBR-3 sejteket jelöltünk donor-jelölt és akceptor-jelölt pertuzumab ErbB2 ellenes antitest keverékkel és a FRET-et áramlási citométerrel határoztuk meg. Kiszámítottuk a ki nem oltott donor fluoreszcencia intenzitást ( $I_d$ ), a FRET intenzitást ( $I_{FRET}$ , lásd (10)-es számú képlet) és ezeket ábráztuk az FSC függvényében kétdimenziós hisztogramok formájában. A piros irányvonalak mutatják az átlag ki nem oltott donor intenzitást (A) vagy FRET intenzitást (B) az FSC függvényében.

Ezt az észrevételt úgy értelmeztük, hogy a magas expressziós szintet mutató sejtek nagyobb méretűek (magas  $I_d \rightarrow$  magas FSC). Mivel elsősorban a nagyméretű sejtek mutatnak magas expressziós szintet, várható, hogy ezen sejtek felszínén az ErbB2 sejtfelszíni sűrűsége nem lesz jelentősen magasabb, mint az alacsony expressziós szintű sejteken (hiszen nemcsak a fehérje szám, de a sejtfelszín is nagyobb). Következésképpen elmondhatjuk, hogy a FRET hatásfok az ErbB2 homoasszociáció esetében független az expressziós szinttől, ami annak tudható be, hogy a sejtfelszínén a fehérjék felületi sűrűség közelítőleg állandó különböző kifejeződési szintek esetében.

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

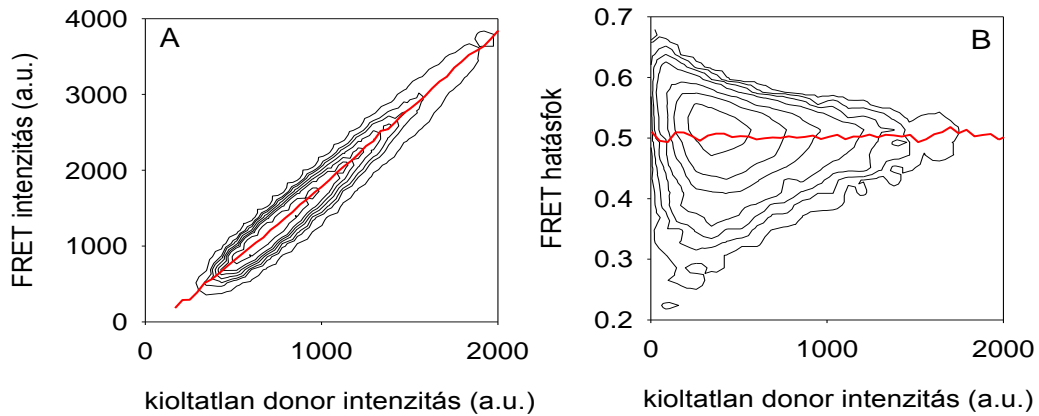
Mivel az intramolekuláris távolságok függetlenek az expressziós szinttől, egy molekula két epitópjának proximitása megbízható referenciaként használható a PLA és a FRET mérések összehasonlítására. Ezért megvizsgáltuk két ErbB2 ellenes antitest (pertuzumab és trastuzumab) epitópja közötti közelségét a két módszerrel. Hasonlóan a fentebb leírt intermolekuláris mérésekhez, az intramolekuláris PLA is telítődést mutatott, amely az átlag fluoreszcencia intenzitásnál  $\sim 2\times$  nagyobb intenzitásoknál kezdődött (36. ábra).



**36. ábra: A PLA jel telítődik a proximitás próba magas sűrűségénél intramolekuláris mérések esetében**

Az ErbB2 molekula két epitópját megjelöltük pertuzumab-„priming” és trastuzumab-„non-priming” antitesttel, hogy detektálni lehessen az intramolekuláris PLA jelet, amit Cy5-jelölt detektáló oligonukleotiddal mértünk. Ugyanakkor a sejteket megjelöltük AlexaFluor488-7C2 antitesttel is, hogy az ErbB2 expressziós szintet mérjük. A kétdimenziós hisztogramra illesztett piros trendvonal mutatja a PLA jelet az ErbB2 expressziós szint függvényében. A kontúr szinteket logaritmikusan definiáltuk. A fekete hisztogramok a felső és a jobboldali ábrán mutatják az AlexaFluor488-7C2 intenzitás eloszlását és a PLA jelet. A kék hisztogram a felső ábrán a jelöletlen sejtek AlexaFluor488 csatornában mért fluoreszcencia intenzitását mutatja. A kék hisztogram a jobb oldali szélső ábrán mutatja a negatív kontroll sejtek PLA jelét, amit csak trastuzumab-„non-priming” antitesttel jelöltünk.

A PLA eredményekkel ellentétben, a FRET intenzitás erős lineáris korrelációt mutatott az expressziós szinttel, míg a FRET határfok állandó volt minden kifejeződési szinten (37. ábra). Elmondhatjuk, hogy PLA-nál a szaturáció jelensége mind intra-, mind intermolekuláris mérések esetében is megnyilvánul, míg FRET esetében telítődési effektust nem tapasztaltunk.



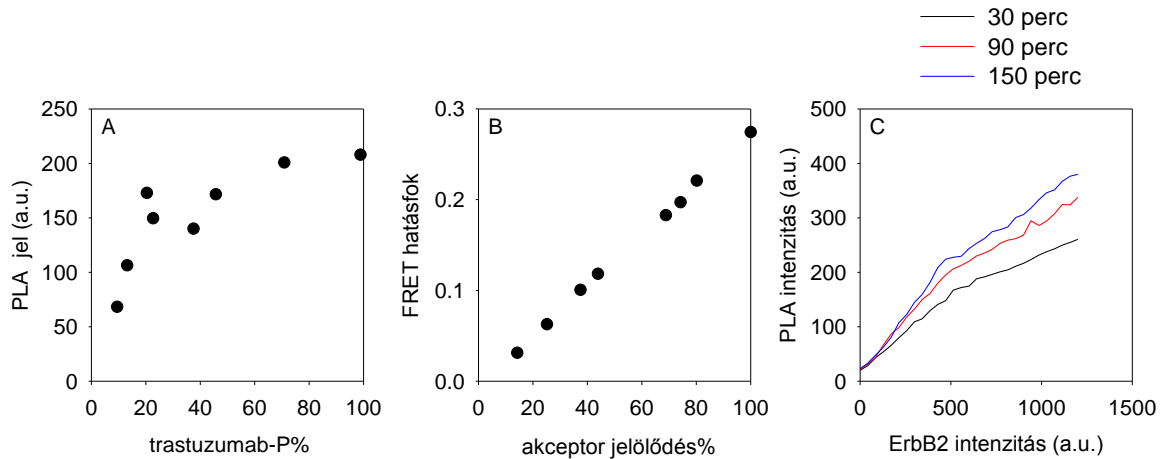
**37. ábra:** Az intramolekuláris FRET hatások állandó, míg a FRET intenzitás lineárisan változik az antitestek sűrűségével

SKBR-3 sejteket jelöltünk donor-jelölt trastuzumabbal és akceptor-jelölt pertuzumabbal, hogy intramolekuláris FRET-et mérjünk áramlási citométerrel az ErbB2 molekula két epitópja között. A ki nem oltott donor fluoreszcencia intenzitást, a FRET intenzitást és a FRET hatásfokot sejtenkénti eljárásban értékeltük ki. A kontúr szinteket logaritmikusan definiáltuk kétdimenziós hisztogramok formájában. A piros trend vonalak mutatják az átlag FRET intenzitást (A) vagy FRET hatásfokot (B) a kioltatlan donor fluoreszcencia intenzitás függvényében.

#### 5.3.4. Az antitestek sűrűsége nagyban befolyásolja a FRET és PLA méréseket

Az előző pontokban ismertetett kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a PLA esetében tapasztalt szaturáció az oligonukleotiddal jelölt proximitási próbák denzitástól függően alakul ki. Ezért egy olyan kísérleti elrendezést terveztünk, amiben a proximitási próbák sejtfelszíni mennyiségét ellenőrzött módon be tudjuk állítani. Egy olyan mintasorozatot állítottuk elő, amelyben a mintákat három antitest (trastuzumab-„priming”, AlexaFluor488-trastuzumab, pertuzumab-„non-priming”) keverékével jelöltük meg. Minden mintához ugyanolyan koncentrációjú pertuzumab-„non-priming” antitestet adtunk, de a trastuzumab-„priming” és AlexaFluor488-trastuzumab antitestek arányát mintánként változtattuk 100%-ról 0%-ra, azaz az AlexaFluor488-trastuzumab antitesttel leszorítottuk a trastuzumab-„priming” antitestek egy részét az ErbB2-ről. A sejthez kötődött trastuzumab-„priming” antitest mennyiségét az AlexaFluor488-trastuzumab fluoreszcencia intenzitásból számítottuk ki. A PLA jel telítődését ábrázoltuk a trastuzumab-„priming” antitest sűrűségének függvényében (38.A. ábra). Ezt követően elvégeztük az ezzel analóg kísérletet FRET esetében is. Itt is készítettünk egy olyan mintasorozatot, amelyben a donorral jelölt pertuzumab mennyisége állandó volt, de az akceptorral jelölt trastuzumab egy részét leszorítottuk jelöletlen trastuzumab hozzáadásával.

A jelöletlen és akceptorral jelölt pertuzumab arányát mintáról mintára változtattuk. A FRET hatásfok az elméletileg megjósolt szigorú lineáris összefüggést mutatta, ha az akceptor mennyiség függvényében ábrázoltuk (**38.B. ábra**). Következésképpen elmondhatjuk, hogy a szaturáció jelensége csak a PLA mérések esetében mutatkozott.



**38. ábra: A telítődési jelenség a PLA-ban az antitest sűrűség és az RCA reakció időtartamának függvényében**

**A.** SKBR-3 sejteket jelöltünk egy olyan antitest keverékkel, amely pertuzumab-„non-priming” próbát és különböző arányban trastuzumab-„priming” és AlexaFluor488-trastuzumab antitesteket tartalmazott. Az intramolekuláris PLA jelet a trastuzumab-„priming” és pertuzumab-„non-priming” antitestek között Cy5-tel jelölt detekciós oligonukleotiddal mértük. A trastuzumab epitóp azon százalékát, amit a trastuzumab-„priming” antitest elfoglal, úgy számoltuk ki, hogy az AlexaFluor488-csatornában mért fluoreszcencia intenzitást kivontuk azon minták intenzitásából, amelyek csak AlexaFluor488-trastuzumabbal voltak jelölve, majd normáltuk a különbséget az utóbbi intenzitására.

**B.** Intramolekuláris FRET hatékonyságot mértünk donor-jelölt pertuzumab és akceptor-jelölt trastuzumab között SKBR-3 sejteken. Pertuzumab epitópát telítettük donor-konjugált antitesttel, míg a trastuzumab-kötő epitóp akceptor-konjugált antitesttel való telítődését változtattuk növekvő koncentrációjú jelöletlen trastuzumab segítségével. Az átlag FRET hatékonyságot 20.000 sejt alapján áramlási citométerrel mértük és az értékeket ábrázoltuk az akceptor-jelölt antitest relatív sűrűségének függvényében (100%=akceptor jele a kompetáló jelöletlen antitest hiányában).

**C.** Intramolekuláris PLA jelet trastuzumab-„priming” és pertuzumab-„non-priming” antitestek között mértünk Cy5-jelölt detekciós oligonukleotiddal. Az RCA reakció időtartama vagy 30 (fekete görbe), vagy 90 (piros görbe), vagy 150 perc (kék görbe) volt. A sejteket megjelöltük AlexaFluor488-konjugált 7C2 antitesttel is, hogy mérni tudjuk az ErbB2 expressziós szintjét. A kétdimenziós hisztogramokat a már korábban említett módon képeztük és a trend vonalak mutatják az átlag PLA jelet az ErbB2 expressziós szintjének függvényében.

### **5.3.5. A PLA telítődési jelenségét az RCA reakció időtartama nem befolyásolja szignifikánsan**

A PLA mérések során konzekvensen megjelenő telítési effektusnak számtalan oka lehet. Az egyik lehetséges pont, ahol ez a nem-lineáris effektus bekövetkezik az amplifikációs RCA reakció. Ezért megvizsgáltuk, hogy a szaturációs effektus kapcsolatban van-e a nukleozid-trifoszfát szubsztrát depléciójával az RCA reakció során. Ezért összehasonlítottuk a PLA jel expressziós szinttől való függését három különböző inkubációs időt (30, 90 és 150 perc) alkalmazva az RCA reakcióhoz. A PLA jel növekedett az inkubációs idővel, de a növekedés nem volt lineáris (**38.C. ábra**). Bár a szaturáció foka folyamatosan növekedett az inkubációs idővel, már a legrövidebb inkubációs időnél is nyilvánvaló volt (**38.C. ábra**). Tehát úgy tűnik, hogy a szubsztrát fogyása a PLA amplifikációs folyamata során nem az egyetlen oka a telítési jelenségnek.

Eredményeinkből kiderült, hogy a FRET hatások az intramolekuláris mérések során független volt a fluorofór denzitásától, míg a FRET intenzitás a **(10)**-es egyenlet szerint lineárisan változott ennek függvényében. Mivel kvantitatív kapcsolat a PLA jel és a kísérleti körülmények között nem ismert, csak találgathatunk a telítődés jelenségének okáról. A sztérikus gátlás a sűrűn elhelyezkedő proximitás próbák között megakadályozhatja az enzimet, hogy részt vegyen az amplifikációs folyamatban. A nem-lineáris hatások bizonyosan szerepet játszanak a PLA-ban, főleg az amplifikációs fázisban, amit a mikroszkópos képeken látható PLA foltok („blobs”) „kvantált”, „minden vagy semmi” jellegű megjelenése bizonyít (**31. ábra**): a PLA foltok mérete és fényessége nagyjából homogén, bár várható, hogy minden egyes foltban nem lehet ugyanolyan mértékű a protein asszociáció és expresszió mértéke. Szintén érdekes megfigyelés, hogy bár egy molekula két epitópjának proximitása valószínűleg homogén a sejtfelszínen, a PLA foltok mégsem egyenletes eloszlásúak. Ezen bizonyítékok arra utalnak, hogy ha a PLA során az amplifikációs lépés beindul, akkor nagyjából ugyanolyan intenzitású és méretű folt alakul ki a lokálisan mérhető protein asszociációtól és expressziós szinttől függetlenül. Ha viszont a sztérikus gátlás vagy statisztikai tényezők miatt az amplifikációs folyamat nem indul be, akkor a PLA jel teljes hiánya figyelhető meg. Következésképpen, az *in situ* PLA csak a kölcsönható molekulák egy frakciójának detektálását teszi lehetővé, mivel a reakció (elsősorban az amplifikációs lépés) nem csak a molekulák közelségétől, de az asszociációs/disszociációs egyensúlyoktól és az enzimikus folyamatoktól is függ [87]. Ezenkívül a dNTP szubsztrát depléciója is hozzájárulhat ezen nem-lineáris hatásokhoz. A fentiek értelmében egy kísérletben a PLA jel

növekedésének hiányát kritikusan kell értelmezni, ugyanis ez jelentheti azt, hogy a kezelés valóban hatástalan a fehérje asszociáció növelésében, de a PLA jel szaturációjára is utalhat.

Összefoglalásként elmondható, hogy bár a PLA előnyösen alkalmazható protein interakciók, poszt-transzlációs módosítások detektálására szöveti mintákon [87], tisztábban kell lennünk a módszer korlátaival. A PLA rendkívül jó jel/háttér arányát ugyanaz az amplifikációs reakció okozza, mint ami valószínűleg felelős a nem-lineáris telítési effektus megjelenéséért [89, 131]. Bár a módszer kidolgozói szerint a PLA, hasonlóan a FRET-hez, „molekuláris vonalzóként” használható a proximitási próba méretének variálásával (pl. IgG vagy Fab alkalmazása és az oligonukleotidok hosszának variálásával) [131], a módszer nem bizonyult eléggé kvantitatívnak. Következtetésünk szerint a PLA csak egy szemikvantitatív módszer a protein asszociációk mérésére.

## 6. Összefoglalás

### 6.1. Az elisidepsin hatásmechanizmusának vizsgálata

Mivel az elisidepsin hatásmechanizmusa nagyrészt ismeretlen volt, ezért vizsgálni kezdtük a drog által kiváltott hatásokat az ErbB receptorokra és a plazmamembránra.

A CHO és A431 sejteken és azok származékain végzett rövidtávú és hosszútávú életképesség vizsgálatok azt bizonyították, hogy sem az ErbB2, sem az ErbB3 fehérjék expressziója nem befolyásolja a sejtek elisidepsin iránti érzékenységet, ugyanis a különböző ErbB expressziós szinttel rendelkező sejtvonalak összehasonlításakor nem találtunk szignifikáns eltérést az IC<sub>50</sub> értékek között.

Az elisidepsin specifikusan megnövelte egy konformáció-szenzitív ErbB3 ellenes antitest kötődését, vagyis egy olyan konformációbeli változást indukált az ErbB3 fehérjében, ami elősegítette a H3.105.5 antitest hozzáférését annak epitópjához, de nem módosította másfajta ErbB2 vagy ErbB3 antitestek kötődését.

Áramlási citometriás FRET méréseink azt mutatták, hogy az ErbB2 és ErbB3 homoasszociációjában szignifikáns csökkenés jelentkezett elisidepsin kezelés során, de a heteroasszociációkra nem volt hatása.

A konfokális mikroszkóppal felvett képek meggyőzően mutatták, hogy az elisidepsin nem módosította az ErbB1 és ErbB2 elrendeződését, de szelektíven indukálta a GPI-horgonyzott és az ErbB3 proteinek plazmamembránból az intracelluláris vezikulumokba történő átrendeződését.

Sikerült bizonyítani, hogy annak ellenére, hogy az elisidepsin változást okoz az ErbB- és GPI-horgonyzott-fehérjék homoasszociációjában és sejten belüli eloszlásában, annak citotoxikus hatása független az ErbB1-3 expressziótól. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia és a Laurdan generalizált polarizációjában okozott változások a drog által a plazmamembrán rendezettségében és fluiditásában okozott változásokra utalnak. Az elisidepsin ezen hatásait nagyon gyorsan kifejti, és ezeket követik az ErbB fehérjék eloszlásában és az aspecifikus membránpermeabilitásban bekövetkezett változások és a sejthalál. Valószínűleg a hatóanyag elsődleges támadáspontja a lipid kettősréteg és a többi feltárt változás az elsődleges hatás következménye.

## **6.2. Trastuzumab kötődés gátlása hialuronsav által emberi emlőtumor mintákban**

Az ErbB2 fehérje az emlőtumor kezelésben egy fontos terápiás célpont. A trastuzumab (ErbB2 ellenes antitest) kombinációja kemoterápiával egy hatékony kezelési mód, de az elsődleges és a szerzett rezisztencia kialakulásának problémája még mindig nagy kihívást jelent. Az egyik lehetséges ok a hialuronsav mennyiségének növekedése lehet, ugyanis ennek felhalmozódását rossz prognózisú daganatokban már bizonyították, ezért munkánk során az ErbB2 expressziót mutató emlőtumor szövetekben vizsgáltuk a trastuzumab kötődés és a helyi HA mennyiség közötti korrelációt. Az antikorrreláció bizonyítását kvantitatív kép analízissel értük el, úgy hogy a pixel intenzitásokat csak a sejtmembránban értékeltük.

Azt találtuk, hogy a normalizált trastuzumab kötődés negatív korrelációt mutat a sejt körüli HA sűrűséggel. A HA hatása a trastuzumab kötődésre jellegzetes volt extrém esetekben is, vagyis alacsony és magas HA sűrűség esetén erős és gyenge kötődést tapasztaltunk. Eredményeink egyezésben állnak korábbi bizonyítékainkkal, melyeket *in vitro* kísérletekben és egér xenograftokon kaptunk.

A HA okozta trastuzumab kötődés gátlásának mechanizmusa ismeretlen annak ellenére, hogy kézenfekvő feltételezések vannak. Valószínűnek tartjuk, hogy a sűrű HA befedi vagy maszkírozza az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját. Ugyanakkor a HA egy olyan lehetséges faktor, ami növeli a malignus daganatokban az intersticiális nyomást és ez a véredények összeomlásához és a hatóanyagok nyomáskülönbség-hajtott transzportjának gátlásához vezethet, vagyis megakadályozza a drog molekulák bejutását a tumor belsejébe [132, 133]. Továbbá a HA vagy az EC mátrix más komponensei a diffúzió lassulását okozhatják. Az állat modellekben kapott korábbi eredmények, miszerint a HA mennyiségének csökkentése jó hatással van a daganatok kezelésében a hagyományos kemoterápiás anyagok, liposzómák és trastuzumab mellett, arra utalnak, hogy a HA egy fontos faktor, ami a tumorokban a hatóanyag hozzáférését limitálja a kötőhelyéhez [38].

Habár a HA nem az egyetlen faktor, amely a trastuzumab rezisztenciához vezethet, eredményeinknek mégis fontos klinikai jelentősége van, ezért a további kutatómunkánk célja a szövetek HA szintjének csökkentése.

### **6.3. A PLA módszer kvantitatív jellegének vizsgálata**

A fehérje kölcsönhatások kimutatására nemrég kifejlesztett eljárás a PLA, amely nehéz kísérleti körülmények között (pl. szöveti metszeteken) is alkalmazható. Bár a módszer kiváló jel/háttér arányához nem fér kétség, még nem elemezték részletesen, hogy mennyire tekinthető kvantitatívnak. A módszer a hosszadalmas jelölési protokoll ellenére vonzónak bizonyult a molekuláris biológiai vagy szövetfestési eljárásokban jártas laborok számára, hiszen a fehérje asszociációkat kvantitatívan mérő többi megközelítéssel ellentétben (ahol is gyakran kell komplex egyenletrendszerek megoldását alkalmazni, egyenleteket illeszteni, pl. FCS, FRET esetében) a PLA kiolvasási paramétere könnyen értelmezhető. Azonban kezdeti eredményeink arra utaltak, hogy a PLA eredmények nem mindig korrelálnak a FRET kísérletek eredményeivel, pl. PLA-val nem sikerült sem nekünk, sem másoknak [134] EGF hatására az ErbB1 receptor homoasszociáció növekedését kimutatni. Ezért szisztematikusan elemeztük, hogy a PLA jel mennyire korrelál a protein asszociáció mértékével.

Demonstráltuk, hogy a PLA jel mind intra-, mind intermolekuláris proximitási vizsgálatok esetén telítési effektust mutat, tehát a protein asszociációk egy bizonyos mértéke felett a jel nem nő tovább. Az oligonukleotiddal jelölt proximitási próbák denzitását jelöletlen antitesttel csökkentettük, és ebben a rendszerben is azt tapasztaltuk, hogy a PLA jel telítésbe fut a proximitási próbák nagy denzitása esetén. Ezen mérésekkel párhuzamosan mindig elvégeztük az analóg FRET kísérletet is, ahol is a FRET jel mindig lineárisan korrelált a protein asszociációval, ill. a fluorofórral jelölt antitestek denzitásával.

Bár a PLA esetében tapasztalható telítési effektus okát nem tudjuk, valószínűnek tartjuk, hogy a jelölési protokoll amplifikációs lépése során történnek azok a nem-lineáris hatások, amelyek a telítés megjelenéséhez vezetnek. Ezért következtetésünk szerint a PLA szemikvantitatív eljárásnak tekinthető.

## 7. Az eredmények kritikai elemzése orvos-biológiai szempontból

Dolgozatomban bemutatott eredmények alapkutatói jelentőségük mellett nyilvánvalóan orvosi szempontból is fontosak. Az előrehaladott daganatok kezelésének a sugárkezelés melletti másik módszere a kemoterápia, melynek jelenlegi fegyvertára elégtelen. Haladás csak akkor képzelhető el, ha új támadáspontú gyógyszereket találunk vagy a már rendelkezésre állókat próbáljuk hatékonyabban használni, kombinálni a rezisztencia elkerülése céljából. A dolgozat **5.1.** és **5.2. fejezetében** tárgyalt eredmények mindkét problémával kapcsolatban jelentős megállapításokat tesznek. Az elisidepsinről korábbi eredmények alapján valószínűsíthető volt, hogy egyedi hatásmechanizmussal rendelkezik, de eredményeink és az időközben megjelent más közlemények [77, 78] minden kétséget kizáróan megerősítik, hogy egy új támadáspontú gyógyszerrel van szó, amely elsősorban a sejtmembrán lipid komponensét támadja meg. Eredményeik szerint folyadék rendezett fázisokat indukál, amelyek a lipid tutajoknak felelnek meg, ami végül a sejtmembrán permeabilizálódásához és nekrotizációhoz vezet. A hatásmód jellege alapján megállapítható, hogy az elisidepsinnek előnyös és hátrányos tulajdonságai is vannak. A tény, hogy nekrotikus sejthalált indukál, kedvező abból a szempontból, hogy a daganatos sejtekben gyakran előforduló, az apoptózist kiváltó jelátviteli folyamatok defektusa nem vezet a gyógyszer iránti rezisztenciához. Ugyanakkor figyelembe kell venni az esetleges terápiás felhasználás során, hogy a nekrotizáció gyulladáshoz vezethet. Mások eredményei alapján az elisidepsin a hidroxilált lipidekhez kötődik, melyeket elsősorban a zsírsav 2-hidroxiláz enzim állít elő. Ez daganatokban gyakran fokozott mértékben fejeződik ki [129], ami az elisidepsin daganat specificitásának hátterében állhat. Ugyanakkor a hidroxilázok működését a hipoxia gátolja a molekuláris oxigén csökkent koncentrációja miatt. Mivel a hipoxia gyakran előfordul előrehaladott daganatokban, ezek elisidepsin iránt rezisztensek lehetnek.

A már elérhető kemoterápiás szerek ésszerűbb használatával kapcsolatban jelentősek a trastuzumab hialuronsav általi maszkírozásáról kapott eredményeink. A munkacsoport korábbi *in vitro* és egér xenograftokkal kapcsolatos eredményei ugyan már valószínűsítették, hogy a hialuronsav magas denzitása gátolja a trastuzumab kötődését [38], de ezen korreláció humán emlőtumor mintákban még igazolatlan volt. A hialuronsav maszkírozó hatásának humán mintákban történt igazolása felveti azt, hogy az ErbB2 overexpresszió mellett a hialuronsav denzitást is mérni kell a trastuzumab terápia hatásosságának mérlegelésekor. Másrészt a hialuronsav szintézis gátlása kombinálható trastuzumab kezeléssel, ami várhatóan

jelentősen fokozza az ErbB2 ellenes antitest hatékonyságát. A 4-metilumbelliferon, amelyet munkacsoportunk is használt egerek hialuronsav szintézisének gátlására, alkalmas humán terápiára is, de daganatok kezelésével kapcsolatos klinikai próbákban még nem tesztelték.

A fehérje kölcsönhatások vizsgálatára számtalan módszer áll rendelkezésre, de ezek többsége kísérletes sejtbiológia körülmények között alkalmazható. A PLA módszer egy olyan ígéretes eljárás, melynek kiváló jel-zaj aránya a metszeteken történő alkalmazást is lehetővé teszi (**5.3. fejezet**). Eredményeink alapján azonban a felhasználás során figyelembe kell venni, hogy a tárgyalt telítési effektusok miatt csak szemikvantitatív módszerről van szó. Ez alapján a PLA elmarad a fehérje klaszterizációt mérő biofizikai módszerek mögött a kvantitatív szempontjából. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy bár szisztematikusan nem vizsgáltuk, a biokémiában és molekuláris biológiában használatos számtalan, fehérje kölcsönhatásokat detektáló módszer teljesítménye is hasonló. Mivel a PLA metszeteken is alkalmazható, így egy olyan módszer áll a patológusok rendelkezésére, amely szemikvantitatív módon becsüli meg a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat.

## 8. Summary

### *8.1. Investigations in the mechanism of action of elisidepsin*

Elisidepsin is a marine-derived anti-tumor agent with unique mechanism of action. Since indirect evidence points to the involvement of ErbB receptor tyrosine kinases and lipid rafts in the mechanism of action of elisidepsin, we investigated the effect of the drug on the distribution of ErbB proteins and systematically compared the elisidepsin sensitivity of cell lines overexpressing ErbB receptors.

The fact that the elisidepsin sensitivity of CHO- and A431-derived cell lines did not correlate with their ErbB protein expression levels argues against a decisive role of ErbB receptors in determining elisidepsin responsiveness. In particular, the finding that overexpression of ErbB2 or ErbB2 and ErbB3 in CHO cells did not alter elisidepsin sensitivity is a strong evidence for the lack of involvement of ErbB2 and ErbB3 in conferring elisidepsin sensitivity.

We have also observed an increase in the binding of H3.105.5, a conformation-sensitive antibody against ErbB3, upon elisidepsin treatment, without modifying the binding of other ErbB2 or ErbB3 antibodies. The specificity of this increase is underlined by the lack of elisidepsin-induced effect on the binding of other antibodies and the fact that heregulin reverses the increased binding of H3.105.5. Flow cytometric FRET investigations revealed that elisidepsin induces a decrease in the homoassociations of ErbB2 and ErbB3 without measurable changes in their heteroassociations.

On the other hand, GPI-anchored proteins (GPI-eGFP, PLAP) and ErbB3 were preferentially redistributed upon elisidepsin treatment from the plasma membrane to intracellular vesicles or sometimes even to the nucleus. We did not observe the internalization of every kind of membrane protein since ErbB1 and ErbB2 persisted in the plasma membrane after elisidepsin treatment. We demonstrated that although elisidepsin induced changes in the homoassociation and cellular distribution of ErbB and GPI-anchored proteins, its cytotoxic effect was independent of the expression of ErbB1-3.

The changes in the fluorescence anisotropy of TMA-DPH and in the generalized polarization of Laurdan immediately after application of the drug preceded cell death and membrane permeabilization. All the effects of elisidepsin were very fast. The rapid induction of cell death preceded by changes in the order and fluidity of the plasma membrane are in agreement with the assumption that the primary target of elisidepsin is the plasma membrane and all other effects are the consequences of the primary membrane effects.

## ***8.2. Trastuzumab binding is inhibited in patients with high hyaluronan production***

ErbB2 is a therapeutical target in the treatment of breast cancer. Although in combination with chemotherapy trastuzumab, the prototypical anti-ErbB2 antibody against breast cancer, is an efficient and well-tolerated drug, primary and acquired resistance is a challenging problem. Since overproduction of hyaluronan has already been shown to lead to poor prognosis in breast cancer, we investigated ErbB2-overexpressing breast cancer tissue samples and correlated trastuzumab binding with the local density of hyaluronan. The demonstration of the anticorrelation between hyaluronan density and normalized trastuzumab binding was made possible by quantitative image analysis and by limiting the evaluation of pixel intensities to the cell membrane.

We found that the normalized binding of trastuzumab showed a negative correlation with the pericellular density of hyaluronan. The influence of hyaluronan on trastuzumab binding was most pronounced in the extreme cases, i.e. low and high hyaluronan densities predicted strong and weak binding of trastuzumab, respectively. The current findings are in agreement with our previous results in which hyaluronan-mediated inhibition of trastuzumab binding was demonstrated *in vitro* and in mouse xenograft experiments.

The mechanism of how hyaluronan inhibits trastuzumab binding is unknown although there are a number of plausible assumptions. It is possible that the dense hyaluronan meshwork directly covers or masks the trastuzumab binding epitope of ErbB2. Alternatively, hyaluronan has been implicated as one of the factors leading to increased interstitial pressure in malignant tumours which results in blood vessel collapse and inhibition of pressure difference-driven transport of drug molecules to the centre of the tumor. In addition, diffusion may also be slowed down by hyaluronan or other components of the extracellular matrix. The demonstration that hyaluronan depletion results in improved tumor penetration of conventional chemotherapeutic drugs, liposomes and trastuzumab in animal models argues in favor of hyaluronan being an important factor limiting the accessibility of drug binding sites in cancer.

Although hyaluronan is by no means the only factor contributing to trastuzumab resistance, our results have important clinical implications and call for testing the hyaluronan level of ErbB2-overexpressing tissue samples and warrant further development of drug candidates lowering tissue hyaluronan levels.

### ***8.3. Quantitative properties of the PLA method***

Although the recent introduction of proximity ligation assay (PLA) into the armamentarium of proteomics opened new possibilities in the investigation of protein interactions, PLA has not been evaluated in a quantitative way. Some discrepancies between PLA and other well established techniques prompted us to compare the results of PLA and fluorescence resonance energy transfer (FRET).

The investigated proteins were labeled with oligonucleotide- or fluorophore-conjugated antibodies and their interactions were analyzed by flow cytometry in order to obtain statistically robust data. The PLA signal for the homoassociation of a membrane protein, ErbB2, reached saturation when plotted against the expression level.

Both intermolecular and intramolecular PLA signals reached saturation at high expression levels. In contrast, the FRET efficiency was independent of, while the FRET signal exhibited a strict linear correlation with the expression levels of proteins. When the density of oligonucleotide- and fluorophore-conjugated antibodies was systematically changed by competition with unlabeled antibodies the FRET signal was linearly proportional to the amount of bound fluorophore-tagged antibodies, whereas the PLA signal was again saturated.

The saturation phenomenon in PLA could not be eliminated by decreasing the duration of the rolling circle amplification reaction. Our data imply that PLA is a semiquantitative measure of protein colocalizations due to non-linear effects in the reaction and that caution should be exercised when interpreting PLA data in a quantitative way.

## 9. Referenciák

1. Quenel, N., et al., *The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases*. Breast Cancer Res Treat, 1995. **35**(3): p. 283-91.
2. Jones, F.E. and D.F. Stern, *Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation*. Oncogene, 1999. **18**(23): p. 3481-90.
3. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1555-62.
4. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 99-110.
5. Nagy, P., et al., *Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using number and brightness analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(38): p. 16524-9.
6. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
7. 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.
8. Holbro, T., et al., *The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8933-8.
9. Wang, L.M., et al., *ErbB2 expression increases the spectrum and potency of ligand-mediated signal transduction through ErbB4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6809-14.
10. Schechter, A.L., et al., *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen*. Nature, 1984. **312**(5994): p. 513-6.
11. Guy, P.M., et al., *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8132-6.
12. Kani, K., et al., *Oligomers of ERBB3 have two distinct interfaces that differ in their sensitivity to disruption by heregulin*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8238-47.
13. Garrett, T.P., et al., *The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 495-505.
14. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
15. Franklin, M.C., et al., *Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex*. Cancer Cell, 2004. **5**(4): p. 317-28.
16. Wilson, K.J., et al., *Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer*. Pharmacol Ther, 2009. **122**(1): p. 1-8.
17. 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.
18. Jones, J.T., R.W. Akita, and M.X. Sliwkowski, *Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors*. FEBS Lett, 1999. **447**(2-3): p. 227-31.
19. Olayioye, M.A., et al., *ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5042-51.
20. Schulze, W.X., L. Deng, and M. Mann, *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0008.

21. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
22. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-13.
23. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
24. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer*. Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
25. Chazin, V.R., et al., *Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor*. Oncogene, 1992. **7**(9): p. 1859-66.
26. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
27. Shapiro, C.L., J. Manola, and M. Leboff, *Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(14): p. 3306-11.
28. Tran, D., et al., *Permanent alopecia following chemotherapy and bone marrow transplantation*. Australas J Dermatol, 2000. **41**(2): p. 106-8.
29. Halverson, K.J., et al., *Regional nodal management and patterns of failure following conservative surgery and radiation therapy for stage I and II breast cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1993. **26**(4): p. 593-9.
30. Pytel, D., et al., *Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(1): p. 66-76.
31. Sioud, M., *Targeted delivery of antisense oligonucleotides and siRNAs into mammalian cells*. Methods Mol Biol, 2009. **487**: p. 61-82.
32. Marschall, P., J.B. Thomson, and F. Eckstein, *Inhibition of gene expression with ribozymes*. Cell Mol Neurobiol, 1994. **14**(5): p. 523-38.
33. Nahta, R., M.C. Hung, and F.J. Esteva, *The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2343-6.
34. Pai-Scherf, L.H., et al., *Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(9): p. 2311-5.
35. Amici, A., F.M. Venanzi, and A. Concetti, *Genetic immunization against neu/erbB2 transgenic breast cancer*. Cancer Immunol Immunother, 1998. **47**(4): p. 183-90.
36. Nagy, P., et al., *Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line*. Cancer Res, 2005. **65**(2): p. 473-82.
37. Bourguignon, L.Y., et al., *Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27913-8.
38. Palyi-Krek, Z., et al., *Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer*. Eur J Cancer, 2007. **43**(16): p. 2423-33.
39. Baselga, J., *Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab)*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 1**: p. 18-24.
40. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
41. Agus, D.B., et al., *A potential role for activated HER-2 in prostate cancer*. Semin Oncol, 2000. **27**(6 Suppl 11): p. 76-83; discussion 92-100.

42. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(4): p. 369-85.
43. Herbst, R.S., et al., *Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(11): p. 2544-55.
44. Cuello, M., et al., *Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2*. *Cancer Res*, 2001. **61**(12): p. 4892-900.
45. Nagy, P., et al., *Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy*. *Pathol Oncol Res*, 1999. **5**(4): p. 255-71.
46. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(2): p. 117-27.
47. Lane, H.A., et al., *Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling*. *Ann Oncol*, 2001. **12 Suppl 1**: p. S21-2.
48. Kono, K., et al., *Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(7): p. 2538-44.
49. Molina, M.A., et al., *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(12): p. 4744-9.
50. Izumi, Y., et al., *Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail*. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 279-80.
51. Barok, M., et al., *Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(7): p. 2065-72.
52. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 443-6.
53. Esteva, F.J., et al., *Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(7): p. 1800-8.
54. Motoyama, A.B., N.E. Hynes, and H.A. Lane, *The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides*. *Cancer Res*, 2002. **62**(11): p. 3151-8.
55. Lu, Y., X. Zi, and M. Pollak, *Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2004. **108**(3): p. 334-41.
56. Yakes, F.M., et al., *Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 4132-41.
57. Price-Schiavi, S.A., et al., *Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(6): p. 783-91.
58. Auvinen, P., et al., *Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(2): p. 529-36.

59. Nagano, O. and H. Saya, *Mechanism and biological significance of CD44 cleavage*. *Cancer Sci*, 2004. **95**(12): p. 930-5.
60. Sugahara, K.N., et al., *Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(9): p. 5861-8.
61. Palyi-Krek, Z., et al., *EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44*. *Cancer Lett*, 2008. **263**(2): p. 231-42.
62. Barok, M., et al., *Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor*. *Cancer Lett*, 2008. **260**(1-2): p. 198-208.
63. Sironen, R.K., et al., *Hyaluronan in human malignancies*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(4): p. 383-91.
64. Toole, B.P., T.N. Wight, and M.I. Tammi, *Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4593-6.
65. Weigel, P.H. and P.L. DeAngelis, *Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(51): p. 36777-81.
66. Day, A.J. and G.D. Prestwich, *Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4585-8.
67. Itano, N. and K. Kimata, *Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression*. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(4): p. 268-74.
68. Wernicke, M., et al., *Breast cancer stromal myxoid changes are associated with tumor invasion and metastasis: a central role for hyaluronan*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(2): p. 99-107.
69. Faircloth, G. and C. Cuevas, *Kahalalide F and ES285: potent anticancer agents from marine molluscs*. *Prog Mol Subcell Biol*, 2006. **43**: p. 363-79.
70. Provencio, M., et al., *Cancer treatments: can we find treasures at the bottom of the sea?* *Clin Lung Cancer*, 2009. **10**(4): p. 295-300.
71. Martin-Algarra, S., et al., *Phase II study of weekly Kahalalide F in patients with advanced malignant melanoma*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(5): p. 732-5.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Molina-Guijarro, J.M., Moneo, V., Martinez-Leal, J.F., Cuevas, C., Garcia-Fernández, L.F., Galmarini, C.M. *PM02734, a new marine-derived antitumoral compound, has rapid effects on membrane integrity and permeability in tumor cells*. in *100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2009*. Denver, CO.
76. Ling, Y.H., et al., *Molecular pharmacodynamics of PM02734 (elisidepsin) as single agent and in combination with erlotinib; synergistic activity in human non-small cell lung cancer cell lines and xenograft models*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(10): p. 1855-64.
77. Molina-Guijarro, J.M., et al., *Irvallec inserts into the plasma membrane causing rapid loss of integrity and necrotic cell death in tumor cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e19042.
78. 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.

79. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
80. Shiroo, M., et al., *CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx*. EMBO J, 1992. **11**(13): p. 4887-97.
81. de Vos, A.M., M. Ultsch, and A.A. Kossiakoff, *Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex*. Science, 1992. **255**(5042): p. 306-12.
82. Oender, K., et al., *Relative quantitation of protein-protein interaction strength within the yeast two-hybrid system via fluorescence beta-galactosidase activity detection in a high-throughput and low-cost manner*. Assay Drug Dev Technol, 2006. **4**(6): p. 709-19.
83. Kerppola, T.K., *Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1278-86.
84. Croston, G.E., *Functional cell-based uHTS in chemical genomic drug discovery*. Trends Biotechnol, 2002. **20**(3): p. 110-5.
85. Eigen, M. and R. Rigler, *Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5740-7.
86. Brock, R., et al., *Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10123-8.
87. Weibrecht, I., et al., *Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(3): p. 401-9.
88. Nagy, P. and J. Szollosi, *Proximity or no proximity: that is the question - but the answer is more complex*. Cytometry A, 2009. **75**(10): p. 813-5.
89. Gustafsdottir, S.M., et al., *Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses*. Anal Biochem, 2005. **345**(1): p. 2-9.
90. Whitelegge, J., *Structural biology. Up close with membrane lipid-protein complexes*. Science, 2011. **334**(6054): p. 320-1.
91. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
92. Vereb, G., et al., *Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8053-8.
93. Cribier, S., G. Morrot, and A. Zachowski, *Dynamics of the membrane lipid phase*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1993. **48**(1): p. 27-32.
94. Hooper, N.M., *Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review)*. Mol Membr Biol, 1999. **16**(2): p. 145-56.
95. Feigenson, G.W., *Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(1): p. 47-52.
96. Radhakrishnan, A. and H. McConnell, *Composition fluctuations, chemical exchange, and nuclear relaxation in membranes containing cholesterol*. J Chem Phys, 2007. **126**(18): p. 185101.
97. 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.
98. Chatterjee, S. and S. Mayor, *The GPI-anchor and protein sorting*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(14): p. 1969-87.

99. Tzahar, E., et al., *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5276-87.
100. Zurita, A.R., et al., *Membrane distribution of epidermal growth factor receptors in cells expressing different gangliosides*. Eur J Biochem, 2004. **271**(12): p. 2428-37.
101. Lidke, D.S., et al., *Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(2): p. 198-203.
102. Dale, R.E., J. Eisinger, and W.E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*. Biophys J, 1979. **26**(2): p. 161-93.
103. van der Meer, B.W., *Kappa-squared: from nuisance to new sense*. J Biotechnol, 2002. **82**(3): p. 181-96.
104. Szöllösi, J., et al., *Principles of resonance energy transfer*. Curr Protoc Cytom, 2006. **Chapter 1**: p. Unit1 12.
105. Szentesi, G., et al., *Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis*. Comput Methods Programs Biomed, 2004. **75**(3): p. 201-11.
106. Nagy, P., et al., *Measuring FRET in flow cytometry and microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2006. **Chapter 12**: p. Unit12 8.
107. Lakowicz, J., *Fluorescence Anisotropy. Principles of Fluorescence Spectroscopy.*, N.Y. Springer, Editor. 2006. p. 353-82.
108. Kuhry, J.G., et al., *TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells*. Cell Biophys, 1983. **5**(2): p. 129-40.
109. Harris, F.M., K.B. Best, and J.D. Bell, *Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(1): p. 123-8.
110. Sanchez, S., et al., *Laurdan Generalized polarization: from cuvette to microscop*, in *Modern Research and Educational Topics in Microscopy Applications in Biology and Medicine*, A. Méndez-Vilas and J. Díaz, Editors. 2007, Formatex. p. 1007-14.
111. Parasassi, T., et al., *Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence*. Biophys J, 1991. **60**(1): p. 179-89.
112. van der Vegt, B., et al., *Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining Her2/neu status in breast cancer*. Mod Pathol, 2009. **22**(7): p. 879-86.
113. Lorincz, T., et al., *HER-2/neu genotype of breast cancer may change in bone metastasis*. Pathol Oncol Res, 2006. **12**(3): p. 149-52.
114. Tammi, R., et al., *Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe*. J Invest Dermatol, 1988. **90**(3): p. 412-4.
115. Gonzalez, R.C., Woods, R. E. and Eddins S.L., *Image Segmentation. Digital Image Processing Using Matlab*, ed. W.R. Gonzalez RC, Eddins SL. 2004: Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall
116. Landgraf, R. and D. Eisenberg, *Heregulin reverses the oligomerization of HER3*. Biochemistry, 2000. **39**(29): p. 8503-11.
117. Kenworthy, A.K. and M. Edidin, *Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 69-84.

118. Kusumi, A., et al., *Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1814-23.
119. Anikovskiy, M., et al., *Resonance energy transfer in cells: a new look at fixation effect and receptor aggregation on cell membrane*. Biophys J, 2008. **95**(3): p. 1349-59.
120. Sharma, P., et al., *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes*. Cell, 2004. **116**(4): p. 577-89.
121. Balogh, G., et al., *The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response*. FEBS J, 2005. **272**(23): p. 6077-86.
122. Engelke, M., et al., *Effect of inhalation anaesthetics on the phase behaviour, permeability and order of phosphatidylcholine bilayers*. Biophys Chem, 1997. **67**(1-3): p. 127-38.
123. Sear, J.W., *What makes a molecule an anaesthetic? Studies on the mechanisms of anaesthesia using a physicochemical approach*. Br J Anaesth, 2009. **103**(1): p. 50-60.
124. Matkó, J. and P. Nagy, *Fluorescent lipid probes 12-AS and TMA-DPH report on selective, purinergically induced fluidity changes in plasma membranes of lymphoid cells*. J Photochem Photobiol B, 1997. **40**(2): p. 120-5.
125. Vest, R., et al., *Use of steady-state laurdan fluorescence to detect changes in liquid ordered phases in human erythrocyte membranes*. J Membr Biol, 2006. **211**(1): p. 15-25.
126. Lopez, P.H. and R.L. Schnaar, *Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(5): p. 549-57.
127. Yin, J., et al., *Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2937-45.
128. Yin, J., et al., *Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas in glycolipid tumor markers*. FEBS Lett, 2010. **584**(9): p. 1872-8.
129. Hama, H., *Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(4): p. 405-14.
130. Myers JL, W.A., Lorch RF., *Research Design and Statistical Analysis*. 3 ed. 2010: New York: Routledge.
131. Soderberg, O., et al., *Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 995-1000.
132. Jain, R.K., *Determinants of tumor blood flow: a review*. Cancer Res, 1988. **48**(10): p. 2641-58.
133. Fukumura, D. and R.K. Jain, *Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 937-49.
134. Leuchowius, K.J., I. Weibrecht, and O. Soderberg, *In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry*. Curr Protoc Cytom, 2011. **Chapter 9**: p. Unit 9 36.

## 10. Közlemények

### 10.1. Az értekezéshez felhasznált publikációk

Tímea Váradi, Janos Roszik, Duarte Lisboa, György Vereb, José Manuel Molina-Guijarro, Carlos Galmarini, János Szöllősi, Peter Nagy

**ErbB protein modifications are secondary to severe cell membrane alterations induced by elisidepsin treatment**

*European Journal of Pharmacology* 667, 91-99. (2011)

IF: 2,737

Maria-Magdalena Mocanu, Tímea Váradi, János Szöllősi, Peter Nagy

**Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay**

*Proteomics* 11, 2063-2070. (2011)

IF: 4,815

Tímea Váradi, Tamás Mersich, Päivi Auvinen, Raija Tammi, Markku Tammi, Ferenc Salamon, István Besznyák Jr, Ferenc Jakab, Zsolt Baranyai, János Szöllősi, Peter Nagy

**Binding of trastuzumab to ErbB2 is inhibited by a high pericellular density of hyaluronan**

*Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (2012)

IF: 2,381

### 10.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikáció

Dezso Szikra, Tímea Váradi, and Istvan P. Nagy

**Preliminary Investigations for the Application of Composite Electrodes in Organic Electrosynthesis**

*Journal of New Materials for Electrochemical Systems* 11, 273-279. (2008)

IF: 0,67

Összesített impakt faktor: 10,603

### 10.3. Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és előadások

Tímea Váradi, Carlos Galmarini, János Roszik, György Vereb, János Szöllősi, Peter Nagy (poszter) (*Outstanding Poster Award*)

**c-erbB receptors are indirectly affected by severe cell membrane modifications induced by Irvalec (PM02734) treatment**

*CYTO 2010 XXV International Congress*, Seattle, Washington, USA, 2010. május 8-12.

Tímea Váradi, Carlos Galmarini, János Roszik, György Vereb, János Szöllősi, Peter Nagy (poszter)

**Az Irvalec által befolyásolt ErbB fehérjék expressziója nem elégséges feltétele az Irvalec szenzitivitásnak**

*40. Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg, 2010. május 18-21.

Tímea Váradi (előadás)

**c-erbB receptors are indirectly affected by severe cell membrane modifications induced by Irvalec (PM02734) treatment**

*PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine*, Debrecen, 2010. május 31 - június 1.

Váradi Tímea (előadás)

**Az elisidepsin által befolyásolt ErbB fehérjék expressziója nem elégséges feltétele az elisidepsin szenzitivitásnak**

*Ph.D. - Konferencia a Tudomány Napja Tiszteletére* (Balassi Intézet Márton Áron Szakkollégiumi Igazgatósága), Budapest, 2010. november 29.

Maria-Magdalena Mocanu, Tímea Váradi, János Szöllősi, Peter Nagy (poszter)

**Comparative analysis of Förster (fluorescence) resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay**

*International Bunsen Discussion Meeting, Förster resonance energy transfer in life science*, Göttingen, 2011. március 27-30.

Maria-Magdalena Mocanu, Tímea Váradi, János Szöllősi, Peter Nagy (poszter)

**Comparative analysis of Förster (fluorescence) resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay**

*CYTO 2011 XXVI Congress of the International Society for Advancement of Cytometry*, Baltimore, Maryland, USA, 2011. május 21-25.

Tímea Váradi (előadás)

**Binding of trastuzumab to ErbB2 is inhibited by a high local density of hyaluronan**

*Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine*, Debrecen, 2011. június 6-7.

Tímea Váradi, Maria-Magdalena Mocanu, Tamás Mersich, Päivi Auvinen, Raija Tammi, Markku Tammi, Zsolt Baranyai, Jakab Ferenc, János Szöllősi, Peter Nagy (poszter)

**Binding of trastuzumab to ErbB2 is inhibited by a high local density of hyaluronan**

*The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress*, Stockholm, 2011. szeptember 23-27.



TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024.

## **11. Köszönetnyilvánítás**

*„ Az a nagyszerű az emberben, hogy soha nem veszíti el a bátorságát és a kedvét újra és újra kezdeni, mert tudja, hogy fontos és érdemes újrakezdenie.”*

A munkám során nyújtott segítségéért, gyakorlati és elméleti tanácsaiért köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Péternek, aki az elmúlt évek során időt és fáradságot nem kímélve mindvégig támogatta fejlődésemet, előrehaladásomat.

Ezúton szeretném megköszönni Prof. Dr. Szöllőssi Jánosnak, hogy lehetőséget adott Ph.D. munkám megvalósításához, és az Intézet Igazgatójaként biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönöm Dr. Szabó Ágnesnek a nekem nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, baráti támogatását, amellyel hozzájárult munkám hatékonyságához.

Külön köszönet illeti Vágóné Toldi Hajnalkát, Farkasné Sánta Gyöngyit és Bedei Mónikát a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk valamennyi jelenlegi és korábbi tagjának, az Intézet valamennyi dolgozójának a munkámhoz nyújtott szakmai segítségükért, hasznos tanácsaikért, valamint mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak értekezésem elkészítéséhez.

Nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani Családomnak és Barátaimnak mindazért a türelemért, támogatásért és biztatásért, amit Tőlük kaptam céljaim eléréséhez.

## 12. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

Jelölt: Váradi Tímea

Neptun kód: E3LY9G

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





**További Közlemények**

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

**Összesített impakt faktor: 10.603**

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

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

Debrecen, 2012.04.27

