

dc_380_12

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

DR. NAGY PÉTER

**AZ ERBB FEHÉRJÉK KLASZTERIZÁCIÓJÁNAK BIOFIZIKAI KARAKTERIZÁLÁSA ÉS
BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE**



Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

2012

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az ErbB fehérjék: klaszterizáció mindenek felett

A transzmembrán jelátvitel vizsgálata központi jelentőségű a sejt- és molekuláris biológiai kutatásokban, hiszen sejtek fiziológiás és patológiás aktivációs folyamatainak első lépésének megismerése mind alapkutatási, mind orvosi szempontból rendkívül fontos. A receptor tirozin kinázok a jelátviteli folyamatok egyik legrészletesebben tanulmányozott résztvevői. Közülük az epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) receptorcsalád képezi ezen dolgozat legfontosabb tárgyát. A családnak négy tagja van, melyeket ErbB1-4 receptoroknak, ill. emberben HER1-4 (HER=human epidermal growth factor receptor) fehérjéknek neveznek. A receptor tirozin kináz aktiváció paradigmája szerint a receptor inaktív állapotban monomerként van jelen a plazmamembránban, majd a ligand megkötése után reverzibilisen dimerizálódik, amelyet a receptor intracelluláris kináz doménjének aktivációja és a transzmembrán jelátvitel aktivációja kísér. Azóta a kép sokkal árnyaltabbá és bonyolultabbá vált. Ennek megértéséhez tekintsük át először röviden az ErbB fehérjék szerkezetét.

Mind a négy fehérje hasonló felépítést mutat. Tartalmaznak egy 620 aminosavból álló extracelluláris domént, egy rövid α -helikális transzmembrán szegmenst és egy intracelluláris részt. Ez utóbbi további részekre osztható: a membránhoz legközelebb a 40 aminosavat tartalmazó juxtamembrán domén, majd a tirozinkináz domén és végül a C-terminális végen a foszfortirozint kötő effektor molekulák kötőhelyei találhatóak. Ligandum hiányában az ErbB2 kivételével a többi receptor extracelluláris doménje ún. zárt konformációt vesz fel, amelyben a II. és IV. domének között intramolekuláris híd képződik. A ligandum kötés a receptor konformációját nyílttá alakítja, amelyben az I. és III. domének egymáshoz közel kerülnek, felszakad a II-IV domének közötti intramolekuláris híd,

és exponálódik a II. domén dimerizációs karja, amely így intermolekuláris kapcsolatokat tud stabilizálni.

Az ErbB2 extracelluláris doménjének viselkedése több szempontból eltér a fentiektől. Egyrészt a receptor konstitutívan nyílt konformációban van, amiben a dimerizációs kar exponált. Másrészt az I. és III. domének közötti ligandkötő zseb túl kicsi. A fentiek miatt az ErbB2 nem képes növekedési faktort kötni, és a többi ErbB fehérje preferált heterodimerizációs partnere. Az ErbB2 csak magas expressziós szint mellett képez homoasszociátumokat, melyeket azonban valószínűleg nem a már leírt dimerizációs kar, hanem a molekula egyéb részei (pl. transzmembrán vagy intracelluláris domének) vagy a lipid környezet stabilizálnak.

A fenti relatíve egyszerű modell számtalan észlelést nem tud megmagyarázni. Valószínűleg az extracelluláris domének önmagukban nem képesek az ErbB fehérjék közötti heterodimerizáció kiváltására, pedig a ligandumok ilyen klasztereket is létre hoznak. A dimerek összetételét egyrészt az ErbB fehérjék expressziós szintje, másrészt a ligandum típusa határozza meg, amelyeket három csoportra oszthatunk: EGF-szerű ligandumok, melyek csak az ErbB1-et aktiválják; neuregulinok (heregulinok), melyek az ErbB3-hoz és ErbB4-hez kötődnek; az ErbB1-et és ErbB4-et aktiváló ligandumok.

Tehát a növekedési faktor kötődik a saját receptorához, majd annak homo- vagy heterodimerizációját váltja ki, ami a receptor aktivációjához vezet. A dimerek stabilizálásában a transzmembrán domén és a kináz domén is részt vesznek. Az ErbB fehérjék kináz doménje a ligandum kötődést követően a ciklin-CDK komplexhez hasonló aszimmetrikus dimert alkot, és az egyik receptor kináz doménje aktiválja a másik receptor kinázát, amit keresztfoszforiláció követ.

Az eddigiek összefoglalásaként kijelenthetjük, hogy bár a ligand indukált dimerizáció sok észlelést megmagyaráz, a receptor asszociációk és aktiváció több

apróbb részletét megmagyarázatlanul hagyja. A legfontosabb ilyen „apróbb” részletek a klaszterizáció két aspektusát érintik:

- a. Egyrészt szinte bizonyosra vehető, hogy léteznek preformált, konstitutív homo- és heterodimerek is.
- b. Másrészt a dimereknél magasabb rendű asszociátumok is léteznek, melyek mérete több száz molekuláig terjedhet. Létezhetnek konstitutív módon vagy ligand által indukáltan. A klasztereket összetartó erők valószínűleg indirektek: lehetnek citoskeletális eredetűek vagy közös lipid doménbe történő particionálás következményei.

1.2. Az ErbB fehérjék biológiai jelentősége: transzmembrán jelátviteli folyamatok

A receptorok ligandum által kiváltott vagy átrendezett asszociációját másodlagos jelátviteli folyamatok aktiválódása követi. Az ErbB fehérjék által generált transzmembrán szignál forrása, ill. alapegysége a receptorok által létrehozott homo- vagy heterodimer. A négy ErbB fehérje közül csak az ErbB1 és ErbB4 tekinthető teljesen átlagos receptor tirozin kináznak, amely mind ligandkötő, mind aktív kináz doménnel rendelkezik. Az ErbB2 képtelen ligandumot kötni, az ErbB3-nak viszont a kináz doménje inaktív. A fentiek értelmében sem az ErbB2, sem az ErbB3 nem képes egymagában transzmembrán jelátvitelre, egymással heterodimerizálva viszont a legaktívabb jelátviteli komplexet alkotják.

A dimerek összetételét egyrészt az aktiváló növekedési faktor, másrészt az adott sejt által kifejezett ErbB receptorok típusa és expressziós szintje határozza meg. Bár a négy receptorból elvileg létrehozható tízféle dimer mindegyikét kimutatták már, az ErbB1, ErbB4 homodimerek és az ErbB2-t magába foglaló heterodimerek a legjelentősebbek. A foszfortirozint kötő másodlagos jelátvivő molekulák szelektíven kötődnek az egyes ErbB fehérjék C-terminális doménjében keletkező foszforilált tirozin aminosavakhoz. Ez biztosítja azt, hogy az ErbB1

elsősorban a foszfolipáz-C, Cbl és MAPK útvonalak aktiválására képes, az ErbB2 kimondottan erősen aktiválja a MAPK útvonalat, az ErbB3 elsősorban a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) serkentésében jár élen, míg az ErbB4 mind a MAPK, mind a PI3K útvonalakat bekapcsolja. Az ErbB2 részvétele a heterodimerekben javítja a jelátvitel hatékonyságát elsősorban a receptor le-regulálódás csökkentésével.

A CD44 többféleképpen vesz részt az ErbB szignalizációban. Egyrészt liganduma, a hialuronsav, által aktiválva serkenti az ErbB2 tirozin foszforilációját, másrészt a HB-EGF prekursor és az azt processzáló MMP-7 proteáz megkötésével egy olyan komplexet hoz létre, amely az ErbB4 (és az ErbB1) aktiválásához vezet. A CD44 hialuronsav által történő aktivációja a jelátviteli folyamatok serkentése mellett kiváltja a CD44 intramembrán proteolízisét is. Az így felszabaduló CD44 intracelluláris domén növeli a sejtek motilitását és így a daganatok metasztázis képzésében is szerepet játszhat.

1.3. Az ErbB fehérjék onkológiai szerepe

Régóta ismert, hogy az ErbB fehérjék számtalan humán daganat kialakulásában szerepet játszanak. Fokozott aktiválódásuknak számtalan módja lehet. Történhet mutáció az ErbB1 kináz doménjében, amely aktiválja annak enzimatis aktivitását vagy deletálódhat az ErbB1 teljes extracelluláris doménje, amely egy konstitutívan aktivált ErbB1 fragmentet (EGFRvIII) hoz létre. Trunkált ErbB2 molekulát találtak emlőtumorokban, melyek expressziója fokozza a sejtek malignitását, és hozzájárul a receptor ellenes antitest terápiával szembeni rezisztenciához. Az ErbB1, ErbB2 és ErbB3 fehérjék aktiválódásáról bebizonyosodott, hogy hozzájárulnak a daganatok keletkezéséhez és progressziójához, de az ErbB4-ről inkább azt feltételezik, hogy anti-onkogén hatású, hiszen sejtprolifерációt gátló szignálok forrása lehet. Az ErbB fehérjék (ErbB1-3) többféle módon járulhatnak hozzá a rosszindulatú daganatok

kialakulásához és progressziójához. Egyrészt fokozzák a sejtproliferációt, gátolják az apoptózis a PI3K-Akt túlélés útvonal aktiválásával. Ez utóbbiban mutat kimagasló hatásosságot az ErbB2-3 heterodimer. Ezeken kívül fokozzák a sejtek motilitását és angiogenezist indukálnak.

Az ErbB2 az emlődaganatok kb. 30%-ban fokozott expressziót mutat, ami a daganat rossz prognózisával jár. A prognosztikus marker szerep mellett az ErbB2 terápiás target is, ami hosszú évtizedek kutatásának eredménye. Az ErbB2-t és általában a receptor tirozin kinázokat kétféle módon lehet gátolni terápiás céllal: az extracelluláris doménhez kötődő, általában humanizált antitestekkel és tirozin kináz inhibitorokkal, melyek közül az ErbB2-t felismerő trastuzumab (Herceptin®) volt az első. Az antitestek hatásmechanizmusa többféle lehet. Egyrészt gátolhatják a növekedési faktor kötődését, kiválthatják az immunrendszer aktiválódását (pl. ADCC reakció által) vagy gátolhatják a receptor aktivitását közvetlenül. Ez utóbbira különösen érdekes példa a pertuzumab, hiszen az antitest az ErbB2 dimerizációs karja által kiváltott receptor dimerizációt sztérikusan gátolja.

1.4. A trastuzumab a receptor orientált kemoterapikumok prototípusa

A trastuzumabot eleinte ErbB2-t fokozottan kifejező emlőtumороk monoterápiájában alkalmazták, majd ezen emlődaganatok standard terápiájává vált más kemoterapikumokkal kombinálva. A trastuzumab hatásmechanizmusával kapcsolatban két elmélet létezik. Az egyik szerint antitest függő celluláris citotoxicitási reakciót (ADCC) vagy komplement függő citotoxikus reakciót (CDC) vált ki, míg a másik elképzelés szerint a tumorelles hatás az antitest közvetlen daganatsejtekre kifejtett gátló hatásából ered. Az utóbbi magába foglalja az ErbB2 és Src mediálta szignálok gátlását és a PTEN foszfatáz következményes aktiválódását és az ErbB2-ErbB3 komplex felbontását, amely az Akt közvetített jelátviteli események blokkolásához vezet. Ezen elsődleges hatások a sejtciklus G1

fázisban történő felfüggesztéséhez, apoptózis indukcióhoz és a DNS szintézis, valamint az angiogenezis gátlásához vezetnek.

Számtalan tényezőt hoztak már összefüggésbe a trastuzumab rezisztenciával. Ilyen pl. a PTEN hiányzó expressziója, a PI3K katalitikus alegységében kialakuló mutáció, más ErbB fehérjéken, Met onkogénen vagy IGF1R-on keresztüli, kompenzatórikusan fokozott jelátvitel és a calpain-1 fokozott expressziója. Szintén rezisztenciához vezet a transzláció alternatív iniciációja révén létre jövő trunkált ErbB2, mivel az így keletkező fehérjének nincs extracelluláris doménje, és az ezt kifejező emlődaganatok nem képesek trastuzumabot kötni. Egy új mechanizmus felfedezésével saját kutatási eredményeink is hozzájárultak a rezisztencia leírásához. Az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben részletesen ismertetendő módon az ErbB2 molekula MUC4 vagy hialuronsav általi maszkírozása és a trastuzumab következményes gátolt kötődése szintén rezisztenciához vezet.

1.5. A lipid membrán doménjei: a lipid tutajok szerkezete és biológiai funkciói

A membránreceptorok aktiválódása klaszterizációjuk megváltozásával jár együtt, ami a membrán lipid környezetében zajlik. A lipidek membránfehérjékre kifejtett hatásának legrészletesebben karakterizált formái a lipid tutajok, melyről sok és részben egymásnak ellentmondó információ halmozódott fel az elmúlt években. A probléma forrását az jelenti, hogy azok a struktúrák, amiket lipid tutajokként különböző módszerekkel (pl. sejtbiológiai, biokémiai megközelítés, mesterséges membránokkal végzett kísérletek, dinamikus egyedi molekula mérések) vizsgálnak, szinte biztos, hogy nem ugyanazt a struktúrát takarják.

Az elmúlt évtizedek vizsgálatai egyértelművé tették, hogy a folyékony mozaik modell több szempontból is revízióra szorul. Kiderült, hogy a lipidek nem struktúra nélküli tengert alkotnak, és hogy a fehérjék ebben nem véletlenszerűen

oszlanak el és nem diffundálnak teljesen szabadon. Ezen szervezettség kialakulásában több tényező vesz részt.

1. Többkomponensű lipid membránokban a lipidek fizikai-kémiai tulajdonságaik miatt hajlamosak szeparált fázisokat vagy (mikro-)doméneket létre hozni. Ezek mérete és élettartama sokféle lehet, néhány nanoszekundumtól egészen a termodinamikailag stabil fázis szeparációig. A stabil domének közül a folyékony rendezett (L_o , liquid ordered) és folyékony rendezetlen (L_d , liquid disordered) domének jelentősek biológiai szempontból. A lipid tutajok fizikai-kémiai tulajdonságaik alapján az előbbinek felelnek meg. A lipidek klaszterizációját eltérő méretük (a zsírsav oldalláncok hossza), a zsírsavak flexibilitásának különbözősége és a lipidek között kialakuló hidrogén kötések váltják ki. Különösen jelentős ebből a szempontból a koleszterol és a szfingolipidek hidrogén kötésekben való részvételi hajlama. A lipid tutajok két másik fontos komponense, a glikolipidek és a 2-hidroxilált zsírsavval rendelkező lipidek, szintén a hidrogén kötések kialakítása miatt játszanak fontos szerepet az L_o domének kialakulásában. A mesterséges membránokban megjelenő lipid domének általában sokkal nagyobbak és stabilabbak, mint élő sejtben megfigyelhető társaik, de a lipid tutajok vélt tulajdonságai közül többet is rekapitulálnak (pl. hideg, nem ionos detergensben való oldhatatlanság).
2. A lipidek közötti fizikokémiai kölcsönhatások mellett a biológiai membránok esetében tekintetbe kell venni a membrán dinamikus változását, leginkább az állandóan folyó endo- és exocitotikus folyamatokat. Számítógépes szimulációk és kísérletek segítségével kimutatták, hogy ezek az aktív folyamatok egyrészt önmagukban is hozzájárulnak a klaszterek létrejöttéhez, ugyanakkor gátolják is túl nagy méretű aggregátumok létrejöttét.

3. A biológiai membránokban a domének létrejöttének szabályozásában szintén nem lehet eltekinteni a fehérjék szerepének tárgyalásától. A lipid tutajokkal kapcsolatban elsősorban a glikozilfoszfatidil-inozitol (GPI) kötött fehérjéket kell megemlíteni, amelyek telített zsírsav tartalmuknak köszönhetően preferenciálisan a lipid tutajokban fordulnak elő. Ezenkívül a lipid módosított perifériás membránfehérjék is lehetnek lipid tutajokkal asszociáltak. A transzmembrán (TM) fehérjék helyzete kicsit bonyolultabb. A membránt egyszer átvéelő fehérjék megoszlását az L_d és L_o domének között a TM hélix és a lipid környezet közötti hidrofób meg nem felelés („hydrophobic mismatch”) határozza meg.
4. A citoszkeleton több ponton is beleszól a domének kialakulásába. Egyrészt korlátozza a μm átmérőjű domének keletkezését, másrészt szubmembrán kerítések létrehozásával korlátozza a lipidek és a TM fehérjék diffúzióját és tranziensen néhány száz nanométer átmérőjű zónákba korlátozza azokat.

A fenti összetett hatások eredményeképpen az élő sejtek membránjában is létre jönnek mikrodomének (lipid és fehérje molekulák aggregátumai), amelyek azonban termodinamikailag nem stabil fázisok, hanem dinamikusan változó képződmények, melyek mérete a néhányszor tíz nanométeres nagyságrendbe esik, és élettartamuk a néhány nanoszekundumtól másodpercekig terjed.

A fent körvonalazott sokféleségben többen próbáltak már rendet teremteni. Egyik próbálkozás szerint a membránban háromszintű doménszerkezet jön létre:

1. A citoszkeletonhoz kötött TM fehérjék által alkotott karók létrehozta domének, melyek átmérője a néhány száz nanométeres tartományba esik.
2. A tulajdonképpeni mikrodomének, melyek megfelelnek a lipid tutajoknak. Átmérőjük a 10 nanométeres skálán van. A lipid tutajokban szfingolipidek,

glikolipidek, telített és hidroxilált zsírsavakat tartalmazó lipidek, koleszterol, GPI-kötött és bizonyos transzmembrán fehérjék találhatók.

3. A kisméretű, *közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások* segítségével kialakuló fehérje aggregátumok (általában dimerek). Ez a szint felel meg az előző fejezetekben említett ErbB fehérje dimereknek.

A fenti, a szerveződési szinteket a lipidek oldaláról megközelítő modellhez hasonló elképzelést mi is javasoltunk, de javaslatunkat elsősorban a fehérje klaszterizációval alapoztuk meg. Ez részletesebben az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben kerül tárgyalásra.

A legjelentősebb lipid mikrodomén, a lipid tutaj, számtalan biológiai folyamatban vesz részt. Egyrészt fontos szerepet játszik az endocitózisban, valamint a transzmembrán jelátviteli folyamatokban. Elképzelhető, hogy egy receptor mind inaktív, mind aktív állapotában a lipid tutajokkal asszociált, de az is, hogy a ligand kötés fokozza a fehérje lipid tutaj iránti affinitását. Az is lehetséges, hogy a lipid tutajok, ill. GPI-kapcsolt fehérjék keresztkötése indukálja a lipid tutajok aggregációját, ami elindítja a transzmembrán jelátviteli folyamatokat. Tehát általánosságban elmondható, hogy az aktiváció növeli a lipid tutajok méretét, és viszont: a lipid tutajok méretének növelése (pl. keresztkötés által) sokszor aktiválja a benne levő fehérjéket.

Az ErbB fehérjéknek is van közük a lipid tutajokhoz. Az ErbB1-ről kimutatták, hogy a lipid tutajok befolyásolják funkcióját. A lipid tutajok, ill. azok gangliozid tartalma csökkenti az ErbB1 ligand iránti affinitását és dimerizációját, és a caveolin gátolja az ErbB1 kináz aktivitását. Az ErbB2 lipid tutajokhoz való viszonyáról az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben lesz szó.

1.6. A fehérjeasszociációk mérésének jelentősége és módszerei

A klaszterizáció mérése a jelátvitellel foglalkozó vizsgálatok alapvető kérdései közé tartozik. Ezen fejezet célja, hogy az egyes módszerek részleteinek

bemutatása és minden eljárás felsorolása nélkül rendszerbe szervezze azokat, és rámutasson arra, hogy mik az egyes megközelítések előnyei és hátrányai. A módszereket célszerű két nagyobb csoportra osztani:

1. Kvalitatív-szemikvantitatív eljárások: Ezeket a módszereket alkalmazzák a legkiterjedtebben a sejt- és molekuláris biológiai kutatások során. Előnyük az egyszerűség, ill. az általános felszereltségű sejtbiológia laborban való megvalósíthatóság, de több potenciális hátulütővel is rendelkeznek.
 - a. Koprecipitáció, kémiai keresztkötés, co-capping, Western blot: a legegyszerűbb és legáltalánosabban alkalmazott módszerek, melyek eredményeit körültekintően kell értelmezni. Amennyiben a módszer antitesttel vagy kémiai ágenssel történő keresztkötést igényel, reális annak az esélye, hogy olyan molekulák is keresztbe kötődnek, amelyek az élő sejtben nem álltak kölcsönhatásban egymással. Másrészt, az élő sejtből történő kivonás során arteficiális aggregátumok is képződhetnek.
 - b. Proximitás ligációs vizsgálat (proximity ligation assay, PLA): Az eljárás alapja az, hogy a vizsgálandó két fehérjét megjelölik oligonukleotidhoz kapcsolt antitestekkel. Amennyiben a két fehérje egymás közelségében van, akkor a később hozzáadott lineáris összekötő oligonukleotidok segítségével cirkuláris DNS képződik, amely RCA (rolling circle amplification, gördülő cirkuláris amplifikáció) reakció segítségével sokszorozható. Ezen termékhez fluoreszcensen jelölt oligonukleotid hibridizálható, amely megjelöli a kölcsönható fehérjék helyzetet. A módszer kvantitatívításának hiányáról az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben részletesen lesz szó.
 - c. Nagy áteresztőképességű szűrésre képes technikák (pl. élesztő két hibrid, bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció): Ezen módszerek alapja, hogy azt a fehérjét („csali”, „bait”), aminek az interakciós partnereit ki

szeretnék mutatni, vagy egy transzkripciós faktor (Y2H esetében) vagy egy fluoreszcens fehérje (BiFC esetében) egy fragmentumához kapcsolják, míg a keresett interakciós partnereket („áldozat”, „prey”) a transzkripciós faktor vagy a fluoreszcens fehérje másik doménjével fuzionáltatják. Ha a csali és az áldozat kölcsönhat egymással, akkor a transzkripciós faktor vagy a fluoreszcens protein két doménje is egymásra talál, és így helyre áll a két részre hasított protein aktivitása: a transzkripció vagy a fluoreszcencia detektálható. 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.

2. Kvantitatív eljárások: Míg az előző pontban említett módszerek esetében esély sincs arra, hogy a kölcsönhatást kvantitatívan jellemezzük, addig az itt tárgyalandó eljárások az interakció valamilyen aspektusát kvantitatív szempontból jellemzik. Lényeges, hogy az egyes módszerek eltérő érzékenységet mutatnak a különböző méretű és stabilitású klaszterekre.
 - a. Kolokalizáció mérése: Amennyiben két fluoreszcensen jelzett fehérje eloszlása fluoreszcens mikroszkópos felvételen hasonló (korrelál egymással), akkor feltételezhető, hogy a két molekula között valamilyen kölcsönhatás van. A kolokalizáció kvalitatív értékelésének széleskörűen elterjedt változata a Pearson féle korrelációs koefficiens, de sok más paraméter is számítható.
 - b. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET): A FRET, amelynek rövidítését néha leírója alapján Förster típusú rezonancia energia transzfernek értelmezzük, egy fluoreszcens, ún. donor molekula és egy nem feltétlenül fluoreszcens akceptor molekula közötti dipól-dipól kölcsönhatás segítségével történő energia átadás. A folyamat során a

dc_380_12

gerjesztett donor molekula foton emisszió nélkül energiát ad át a környezetében levő akzeptornak, melynek feltételei a következők: (1) a donor és az akceptor távolsága 2-10 nm legyen; (2) a donor és az akceptor orientációja megfelelő legyen, amit a κ^2 orientációs faktorról jellemeznek; (3) a donor normalizált emissziós és az akceptor abszorpciós spektrumai egymással kellő mértékű átfedést mutassanak, amit a J átfedési integrállal írunk le. A FRET sebességi állandóját a következő egyenlet adja meg:

$$k_{FRET} = konst \cdot J \cdot n^{-4} \cdot k_f \cdot R^{-6} \cdot \kappa^2 \quad (1)$$

ahol n a közeg optikai törésmutatója, R a donor-akceptor távolság és k_f a fluoreszcencia sebességi állandója. Az R és a κ^2 tagokon kívül a többi paraméter konstansnak tekinthető. Mivel a leggyakoribb esetben a κ^2 tag dinamikus átlagolódáson megy keresztül a donor és akceptor egymáshoz képesti gyors rotációja miatt, ezért annak értéke is konstansnak tekinthető. Számítások szerint dinamikus átlagolódás esetén $\kappa^2=2/3$. Így ebben az esetben a FRET hatásfok csak a távolságtól függ, és így a folyamat távolságmérő módszernek használható. A FRET hatásfok (E) megadja azon gerjesztett donor molekulák arányát, melyek FRET hatására relaxálódnak:

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_{FRET} + k_f + k_{nf}} \quad (2)$$

A távolságfüggés világos kifejezése érdekében többször használják a következő egyenletet:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3)$$

dc_380_12

ahol R_0 az ún. kritikus Förster távolság, amely egy adott donor-akceptor párra megadja azt a távolságot, ahol $E=50\%$. A FRET gyakorlati alkalmazhatóságát meghatározza az, hogy milyen mérhető folyamatokban manifesztálódik. Ezt külön kell a FRET kétféle változata esetében tárgyalni.

(1) Hetero-FRET: konvencionális FRET-nek is szokták nevezni. Ebben az esetben a donor és akceptor molekulák spektroszkópiailag különböznek egymástól. Ebben az esetben a FRET hatására csökken a donor fluoreszcencia intenzitása és fluoreszcencia élettartama (fluoreszcencia kioltás, „quenching”). A donor élettartamának csökkenése még több mérhető változáshoz vezet. (i) nő a donor fluoreszcencia anizotrópiája. (ii) a donor kioltás egy másik detektálási módszere az akceptor fotoelhalványításán (photobleaching) alapszik. (iii) Lassul a donor fotoelhalványítási kinetikája.

A hetero-FRET mérésének egy másik lehetőségét adja az akceptor fluoreszcenciájának növekedése (szenzitizált emisszió), amennyiben az akceptor fluoreszcens. Mivel a donor és az akceptor közötti szinte mindig van spektrális átfedés, ennek kiszámítása mindig az átvilágítások ismeretében kell, hogy történjen, és a műszertől, ill. a festékektől függ.

(2) homo-FRET: ebben az esetben a donor és az akceptor spektroszkópiailag megkülönböztethetetlen, azaz ugyanolyan kémiai szerkezetű és ugyanabban a környezetben levő molekula. A folyamatnak ugyanazok a feltételei, mint a fentebb felsoroltak, azzal a kiegészítéssel, hogy a J átfedési integrál itt egyazon molekula abszorpciós és normalizált emissziós spektruma között értendő. Ennek van egy további fontos következménye. A donor molekula által homo-FRET-tel gerjesztett

akceptor egy további homo-FRET kölcsönhatásban lehet donor, és így az energia szétterjed a klaszterben. Ez lehetőséget teremt arra, hogy homo-FRET mérésekkel a klaszter méretét meghatározzuk. A homo-FRET során nincs fluoreszcencia kioltás, a folyamat sem intenzitás, sem élettartam méréssel nem detektálható. A homo-FRET egyetlen mérhető manifesztációja a donor fluoreszcencia anizotrópiájának csökkenése. Mivel az anizotrópiát nemcsak a FRET határozza meg, ezért molekuláris asszociáció mértékével való korreláltatása problémás. Ennek kiküszöbölésére az anizotrópiát vagy időfüggően mérik vagy a fluorofór koncentrációtól való függését elemzik. Ennek részletei az „Eredmények és megbeszélés” fejezetben kerülnek tárgyalásra.

- c. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS), „number and brightness” analízis (N&B): Az FCS esetében egy konfokális mikroszkóp detekciós térfogatában a fluoreszcencia fluktuációját mérik. Ha egy fehérjét jelölünk fluoreszcensen, akkor annak homoasszociációját lehet detektálni. FCS esetében a fluoreszcencia autokorrelációs függvényét számítják ki, amiből meghatározható az egy pixelben levő molekuláris egységek (monomerek, dimerek, stb.) száma és a laterális diffúziós állandó is, ill. minden olyan folyamat sebességi állandója, amely fluoreszcencia fluktuációhoz vezet. A homo-oligomerizáció fokát az átlagos fotonszám és a molekuláris egységek számának hányadosából lehet kiszámolni.

A N&B mérések az FCS alapelveire épülnek. Az elv megértéséhez vizsgáljuk meg egy pixel fluoreszcencia intenzitásának varianciáját. Ennek két komponense van: (1) az egy pixelben levő molekulák számának fluktuációja (σ_N^2); (2) a foton detektálás Poisson statisztikája (σ_D^2). A teljes varianciát (σ^2) a két komponens összege adja meg. Defináljuk a

látszólagos fényességet (B) a variancia és az átlagos intenzitás hányadosaként, és helyettesítsük be a két variancia komponens leíró tagot:

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle I \rangle} = \frac{\sigma_N^2 + \sigma_D^2}{\varepsilon \langle N \rangle} = \frac{\varepsilon^2 \langle N \rangle + \varepsilon \langle N \rangle}{\varepsilon \langle N \rangle} = \varepsilon + 1 \quad (4)$$

ahol ε a molekuláris fényesség, N a molekulák száma, I a fluoreszcencia intenzitás, a $\langle \rangle$ zárójel az időbeli átlagot jelenti. Látható, hogy a molekuláris fényesség a látszólagos fényességből könnyen számítható. Ha ismerjük egy monomer molekuláris fényességét, a homo-oligomerizáció foka meghatározható.

- d. Diffúzió mérésén alapuló módszerek (egyedi partikulum követés (single particle tracking, SPT), fluoreszcencia visszatérés fotoelhalványítás után (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)): Mindkét módszer esetében a jelölt (FRAP esetében fluoreszcensen, SPT esetében fluoreszcensen vagy arany gömbbel) molekulák diffúzióját követjük, és a diffúziós állandó asszociációtól (tehát hidrodinamikai sugártól) való függéséből lehet az oligomerizáció mértékére következtetni.
- e. Lokalizáció mérésén alapuló módszerek (stimulált emisszió deplációs mikroszkópia (stimulated emission depletion microscopy, STED), sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM), fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (photoactivation localization microscopy, PALM)): Az itt röviden leírt technikák azon a feltevésen alapulnak, hogy a molekuláris asszociációk jellemezhetők akkor, ha az egyedi molekulák pozícióját nanométeres pontossággal ismerjük. Ilyenkor két molekula akkor tekinthető egymással asszociáltnak, ha néhány nanométerre vannak

egymástól. Hogy mindez fluoreszcens mikroszkóppal keresztülvihető legyen, át kell lépni az ún. Abbé féle határt, ami a diffrakción alapuló leképező rendszerekben a feloldóképességet limitálja. A három technika közül a STED esetében egy lézernyalábbal a diffrakció által meghatározott területen gerjesztik a fluorofórokat, majd egy fánk alakú nyaláb segítségével indukált emisszióval depletálják a gerjesztett energiaszintet. A depletáló nyaláb intenzitásának beállításával elérhető, hogy a gerjesztett molekulák egy néhány nanométeres átmérőjű területre korlátozódjanak.

A PALM és a STORM technikák közös, de a STED-től eltérő elven alapulnak. Mindkettő esetében azt használják ki, hogy egy fluorofór helyzete nanométeres pontossággal meghatározható, ha képe nem fed át más fluorofórok képével. Ehhez azt kell elérni, hogy a fluoreszcensen jelölt mintában egyszerre a fluorofórok töredéke legyen gerjeszthető állapotban. A PALM esetében ezt fluoreszcens proteinek fotoaktiválásával, míg a STORM esetében cianin típusú festékek fotokapcsolásával („photo-switching”) érik el.

A kvantitatív módszerek nyilvánvaló előnye, hogy számszerűsítik a protein klaszterizáció valamilyen aspektusát. Azonban tekintettel kell lenni arra, hogy a fent ismertetett módszerek érzékenységet jelentősen befolyásolja, hogy a vizsgált asszociátum milyen időskálán stabil és milyen méretű (hány protein van benne és hány nanométer az átmérője). A strukturális vizsgálómódszerek (röntgen krisztallográfia, NMR) tényleges molekuláris asszociátumokat mutatnak ki, amikor a vizsgált fehérjék között közvetlen kontaktus alakul ki. A hetero-FRET a fehérjék 2-10 nm-es szeparációs távolsága esetén utal a kölcsönhatás jelenlétére. Így a FRET jelezhet valódi molekuláris asszociációt vagy egybezártságot („co-confinement”) is, amikor a

dc_380_12

fehérjéket valami nem engedi messzire eltávolodni egymástól. A homo-FRET az energia klaszterben való szétterjedése miatt érzékenyebb a nagyobb méretű klaszterekre, mint a hetero-FRET. Az FCS és a hasonló elven működő eljárások (pl. N&B) szintén jelezhetnek valódi molekuláris asszociációt és egybezártságot is, de itt az egybezártság dimenzióját a mikroszkóp feloldóképessége határozza meg. A diffúzió mérésén alapuló eljárások inkább az egybezártságot, semmint a közvetlen molekuláris interakciókat mutatják ki.

2. Célkitűzések

A receptor-klaszterizációval kapcsolatban a következő terveket tűztük ki:

- Új fluoreszcenciás módszereket kívántunk kifejleszteni a receptor klaszterizáció kvantitatív analízisére.
- Meg kívántuk vizsgálni, hogy léteznek-e dimernél nagyobb molekuláris klaszterek, és ha igen, akkor mi az összetételük és a biológiai szerepük.
- Össze kívántuk hasonlítani az ErbB1 és ErbB2 fehérjéket klaszterizációs tulajdonságaik szempontjából.
- Meg kívántuk vizsgálni, hogy a lipid tutajok és más ErbB fehérjék lokális denzitása hogyan befolyásolja az ErbB2 homoklaszterizációját és szignalizációs tulajdonságait.
- Elemezni kívántuk, hogy az ErbB1 EGF indukálta internalizációját a többi ErbB fehérje hogyan befolyásolja.

Munkánk során az ErbB receptorokat és a lipid tutajokat terápiás felhasználhatóságuk szempontjából is meg kívántuk vizsgálni.

- A trastuzumab rezisztencia kialakulásának (egyik) molekuláris mechanizmusát kívántuk leírni a rezisztencia jelenségét mutató JIMT-1 sejtek segítségével. A vizsgálatokat mind *in vitro*, mint *in vivo* körülmények között el kívántuk végezni.
- Célul tűztük ki, hogy az ErbB receptorklaszterek és a velük kölcsön ható egyéb molekulák (pl. CD44) által alkotott asszociátumok biológiai szerepét vizsgáljuk a receptor orientált terápia szempontjából.
- Meg kívántuk vizsgálni, hogy az RNS interferencia felhasználható-e az ErbB1-et fokozottan kifejező sejtek elpusztítására.
- Az elisidepsin nevű experimentális kemoterápiás szer hatásmechanizmusát, ill. annak ErbB fehérjékkel való kapcsolatának vizsgálatát is célul tűztük ki.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtek, antitestek, növekedési faktorok

A kísérletek során felhasznált sejteket vagy az ATCC-től (American Type Culture Collections, ATCC, Manassas, VA) vagy kollaborációs partnereinktől szereztük be. Az A431 sejtek különböző ErbB fehérjék fluoreszcens proteinnel fuzionált változatával stabilan transzfektált alvonalait mi állítottuk elő. A sejtvonalak ErbB expressziós profilját Qifikit (Dako, Glostrup, Dánia) segítségével határoztuk meg. A transzfektált sejteket vagy Lipofectamine 2000 (plazmid esetében) vagy Oligofectamine (siRNS esetében) segítségével állítottuk elő (mindkettő az Invitrogen terméke), ill. bizonyos esetekben elektroporációt végeztünk a Lonza cég Nucleofector készülékével.

A növekedési faktorokat (EGF, heregulin- β 1) az R&D-től (Minneapolis, MN) szereztük be. Az EGFR455, az Mab528 és a Hermes-3 antitesteket hibridóma felülúszóból izoláltuk protein A affinitás kromatográfiával. Az egyéb antitestek forrása: trastuzumab (Herceptin®) – Roche Magyarország Kft; 2C4, pertuzumab (Omnitarg®), 7C2 – Genentech (South San Francisco, CA); OP15 – Merck (Schwalbach, Németország); Ab18, H3.90.6, H3.90.12, H3.105.5, H4.77.16, Ab1-Clone 24-31 – LabVision (Fremont, CA); α MUC4 – Kermit Carraway (University of Miami, FL); anti-CD44cyto pAt – Hideyuki Saya (Keio University, Tokio). A tisztított hialuronsav fragmentek a Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan) ajándékai voltak. A fluoreszcens kolera toxin B alegységet (CTX-B) az Invitrogentől vásároltuk. A TMA-DPH-t (4'-(trimetilammónió)-difenilhexatrién), a Laurdant (6-dodecanoil-N,N-dimetil-2-naftilamin) és a 4-metilumbelliferont (4-MU) a Sigma-tól (St. Louis, MO) vettük. Az elisidepsint kollaborációs partnerünk állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre. A hialuronsav jelöléséhez használt biotinált HABC kollaborációs partnerünkől, Markku Tammitól (University of Turku, Finnország) származott. Az

antitesteket fluoreszcens festékekkel a gyártók előírásainak megfelelően jelöltük meg.

3.2. Xenograft tumorok létrehozása

A súlyos kombinált immundeficienciában (SCID) szenvedő C.B.-17-scid/scid egérpopuláció a Fox Chase Cancer Center-ből (Philadelphia, PA) származott és patogénmentes környezetben volt elhelyezve. Hét hetes nőtény SCID egereket $5 \cdot 10^6$ db JIMT-1 sejttel oltottunk be szubkután. A trastuzumabot 5 $\mu\text{g/g}$ -os dózisban heti intraperitoneális oltás formájában adtuk az egereknek. A kontroll állatoknak 100 μl fiziológiás só oldatok injektáltunk intraperitoneálisan. A 4-MU-t 3 mg/g-os dózisban adtuk az állatoknak mindennap kétszer szájon keresztül. Az állatokat CO_2 inhalációval áldoztuk fel. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyezte (engedélyek számai: 7/2002/DEMÁB; 13/2010/DEMÁB).

3.3. RNS interferencia

Az ErbB1, GFP-2 és MUC4 ellenes siRNS szekvenciákat mi terveztük, és vagy Thomas Tuschl laboratóriumában (Combinatorial Chemistry Group, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Göttingen, Németország) vagy a Qiagen (Hilden, Németország) céggel szintetizáltattuk. A CD44 ellenes siRNS-t a Dharmacon (Chicago, IL) tervezte és szintetizálta. Az ErbB3 expresszió gátlásához a Sigma „MISSION shRNA” plazmidot használtuk.

3.4. Sejtek fluoreszcens jelölése antitestekkel szuszpenzióban és fedőlemezen

A sejteket rendszerint kamrás fedőlemezre („chambered coverglass”, Nalge Nunc International, Rochester, NY) növesztettük. Amennyiben sejtfelszíni antigént jelöltünk, PBS-ben történő mosást követően az antitestek telítőkonzentrációjával jelöltük a sejteket 30 percig jégen. Az antitesteket 0.1% BSA-t tartalmazó PBS-ben oldottuk fel. Amennyiben intracelluláris antigént jelöltünk, a

procedúra elején 3.7%-os formaldehidben fixáltuk a sejteket, majd kétszeri Tris pufferben történő mosást követően a jelölés a fentieknek megfelelően történt, kivéve, hogy az antitesteket 0.1% BSA-t és 0.1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben oldottuk fel. Amikor a fluoreszcensen jelölt sejteket áramlási citométeren vizsgáltuk, a jelölés előtt feltripszinezttük őket. A jelölés menete alapvetően megegyezett a fentiekkel.

A xenograft tumormetszetek jelölése előtt a tumort az elaltatott állatokból eltávolítottuk, Shandon Cryomatrix-ba (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) ágyaztuk be és folyékony nitrogénben tároltuk. Hús μm vastag metszeteket készítettünk (Shandon AS-620E Cryotome, Thermo Electron Corporation), amiket szilanizált tárgylemezre helyeztünk és 4%-os formaldehiddel fixáltunk 30 percig. Kétszeri, 1%-os BSA-t tartalmazó PBS-ben történő mosást követően a jelölést a fenti protokoll szerint végeztük azzal az eltéréssel, hogy az elsődleges antitestekkel egész éjszakán keresztül, a másodlagos antitestekkel 1-2 órán keresztül jelöltünk. A hialuronsav jelöléséhez először a Molecular Probes „Endogeneous biotin blocking kit”-jével kezeltük a metszeteket, majd 5 $\mu\text{g/ml}$ biotinált HABC jelenlétében inkubáltuk a mintákat egész éjszakán keresztül 4 °C-on. A fluoreszcens avidinnel történő jelölés előtt a mintákat ötször mostuk PBS-BSA pufferrel.

3.5. Sejtek fluoreszcens jelölése Sfp transzferáz segítségével

Az Sfp foszforantepiteinil transzferáz-His₆ enzimet (röviden Sfp transzferáz) a pET29-Sfp törzsből (Jun Yin, Harvard Medical School) izoláltuk az előírásoknak megfelelően. Az Atto565-KoA-t Atto565-meleimidből (Atto-Tec GmbH) és a KoA dilitium sójából (Sigma-Aldrich) szintetizáltuk és tisztítottuk publikált protokolloknak megfelelően. Az ACP címkével rendelkező ErbB2-t kifejező sejtek membránját 5 μM Atto565-KoA-val jelöltük meg 0.2 μM Sfp-transzferáz

segítségével 10 mM MgCl_2 -ot tartalmazó Tyrode pufferben 20 percig szobahőmérsékleten, amit kétszeri mosás és N&B analízis követett.

3.6. Immunfluoreszcens és hetero-FRET mérések áramlási citometriával

A dolgozatban tárgyalt kísérleti eredmények során az áramlási citométeres méréseket Becton Dickinson FacsCalibur, FacsStar Plus, FacsVantage-Diva és FacsArray, ill. Coulter Epics Elite műszereken hajtottuk végre. A gerjesztési lézervonalak hullámhosszát, ill. az emissziós oldalon az optikai filtereket és dikroikus tükröket a használt fluorofóroknak megfelelően választottuk meg. Legalább tíz-húsz ezer sejt adatait lista módú fájlban mentettük el, és a kiértékelést vagy Reflex vagy FCS Express (DeNovo Software) program segítségével hajtottuk végre. Az áramlási citometriás FRET mérések alapelve minden esetben az volt, hogy minden sejtről három fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, melyek a donor, FRET és akceptor csatornáknak feleltek meg. A donor csatornában a gerjesztési és emissziós hullámhosszak a donornak feleltek meg, az akceptor csatornában az akceptor fluorofórának, míg a FRET csatornában a gerjesztés a donor abszorpciós spektrumának megfelelően történt, az emissziót pedig az akceptor emissziós spektrumának megfelelő hullámhossztartományban mértük. A FRET hatásfok meghatározásához használt mintát mind donor, mind akceptor fluorofórral megjelöltük. A spektrális átfedések korrekciójához szükséges paramétereket egyszeresen (vagy csak donorról vagy csak akceptorral) jelölt mintákon határoztuk meg. A FRET hatásfok sejtenkénti meghatározását ReFlex program segítségével végeztük.

3.7. Immunfluoreszcens és FRET mérések mikroszkópban

Az immunfluoreszcens méréseket Zeiss LSM 410, LSM510 vagy Olympus FV1000 konfokális mikroszkópokon hajtottuk végre. A gerjesztési és detektálási hullámhosszak kiválasztása a fluorofóroknak megfelelően történt. Három különböző megközelítést használtunk a FRET mérések végrehajtására: (1) Donor

fotoelhalványítási kinetika analízise: az egyik fehérjét egy könnyen fotoelhalványítható festékkel jelöltük meg, míg a másik fehérjét egy a donornak megfelelő akceptor fluorofórral. Megmértük a donor fotoelhalványítási kinetikáját a fenti kettősen jelölt mintában és csak donorral jelölt sejteken, és a két kinetika időállandójának összevetéséből kiszámítottuk a FRET hatásfokot. (2) Akceptor fotoelhalványítás mérése: a mintát egy fotostabil donorral és egy fotolabilis akceptorral jelöltük meg. A donor csatornában felvettünk egy képet a mintáról az akceptor fotoelhalványítása előtt és után, és az intenzitások felhasználásával kiszámítottuk a FRET hatásfokot. (3) Intenzitás arányon alapuló („ratiometric”) módszer: az eljárás elvi alapja azonos az áramlási citometriás FRET méréseknel fentebb leírtakkal.

3.8. N&B mérések konfokális mikroszkópon

A N&B mérések kivitelezéséhez egy Olympus IX81 mikroszkópot használtunk FluoView FV1000 konfokális konfigurációval. A méréseket a Digman és mtsai által leírt módon hajtottuk végre. Az élő, fedőlemezre növesztett sejteket 10 mM glükózt és 0.1% BSA-t tartalmazó Tyrode pufferben vizsgáltuk szobahőmérsékleten. A képeket a mikroszkóp pszeudo-fotonszámláló módjában vettük fel. A mérések során a vizsgált sejtek fedőlemezhez közeli rétegéről 50-100 képet rögzítettünk, és a képsorozatot egy általam fejlesztett, DiplImage (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) függvényeket használó Matlab (Mathworks, Natick, MA) program segítségével értékeltük ki.

3.9. Antitestek internalizációjának mérése

Az antitestek internalizációjának áramlási citometriás mérése előtt a sejteket fluoreszcens antitesttel vagy EGF-fel jelöltük jégen, majd két mintát vettünk (A – kontroll, teljes fluoreszcencia intenzitás; B – savval mosott, internalizált fluoreszcencia). Ezt követően a mintát 37°C-on inkubáltuk, és a kívánt időpontokban ismét mintát vettük belőle, amelyeket azonnal jégre helyeztünk. A

kísérlet végén a B jelű és a különböző időpontokban vett mintákhoz 15-szörös térfogatnyi savas puffert adtunk („acid strip”: 0.5 M NaCl, 0.1 M Gly, pH 2.8) és 3 percig inkubáltuk jégen, míg az A jelű mintához ugyanakkora térfogat PBS-t adtunk. Mosás és PBS-ben történő reszuspendálást követően a fluoreszcencia intenzitást áramlási citométeren határoztuk meg, és az internalizált hányadot a savas mosás által létrehozott intenzitás csökkenés alapján határoztuk meg.

Más esetben az ErbB fehérjék antitest által indukált szabályozódását vizsgáltuk. A trastuzumab által indukált ErbB2 szabályozódás esetében a sejteket jelöletlen trastuzumabbal kezeltük 37°C-on, majd a sejtfelszínen maradt ErbB2-t egy a trastuzumabbal nem kompetáló ErbB2 ellenes antitesttel (pl. 7C2) jelöltük, és a fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük.

Az internalizáció kvantitatív meghatározására mikroszkópos eljárás is használható. A vizsgálandó membránfehérjét fluoreszcensen megjelöltük, majd a kezelést követően konfokális mikroszkópos képet készítettünk a sejtekről. A képeken a sejtmembrán azonosítását (l. 2.13 fejezet) követően a membránt jelentő vonaltól 5-10 pixelre levő területet hozzárendeltük a membrán maszkhoz. Az így megvastagított membrán maszkon belüli területet az intracelluláris területként értelmeztük. A membrán és az intracelluláris maszkon belüli fluoreszcencia intenzitást háttér korrigáltuk és összegeztük. Az internalizáció jellemzésére az intracelluláris és membrán maszkokban levő összegzett, háttér korrigált fluoreszcencia intenzitások hányadosát használtuk.

3.10. A sejtek életképességének vizsgálata

A vizsgált anyagok életképességre gyakorolt hatását rövid- és hosszútávon vizsgáltuk. A rövidtávú hatást mikrofluorimetriás propidium jodid felvétel segítségével határoztuk meg. A gyógyszerek életképességre gyakorolt hosszútávú hatását WST-1 reagens (Roche Applied Science, Mannheim, Németország) határoztuk meg, amely a mitokondriális dehidrogenázok aktivitását méri.

3.11. Sejtciklus eloszlás meghatározása áramlási citométer segítségével

A sejteket feltripszineztek, majd 70%-os etanolban fixáltuk 4°C-on egy éjszakán át. Rehidratációt követően a sejteket 100 µg/ml propidium joddal (Sigma-Aldrich) jelöltük 100 µg/ml RNáz jelenlétében 60 percig 37 °C-on, majd Coulter Epics Elite áramlási citométeren analizáltuk. Az eredményeket egy alternatív jelölési protokoll segítségével megerősítettük, amely szerint a sejteket hipotónikus fluorokróm oldatban jelöltük (50 µg/ml propidium jodid 0.1% nátrium-citrátban, 0.1% Triton X-100) 4°C-on egy éjszakán át. A sejtciklus analízist a Cylchred program (Department of Hematology, College of Medicine, University of Wales) segítségével végeztük.

3.12. Fluoreszcencia anizotrópia és generalizált polarizáció (GP) mérése fluoriméteren

A feltripszinezett sejteket 10^7 /ml-es koncentrációban vettük fel Hank's pufferben, és 2 µM TMA-DPH-val vagy 2.5 µM Laurdannel jelöltük meg szobahőmérsékleten 20 percig. A TMA-DPH-val történő jelölést követően a sejteket mosás nélkül kihígítottuk 10^6 /ml-es koncentrációra a fluoriméteres mérésekhez, míg a Laurdannel jelölt sejteket egyszer mostuk és Hank's pufferben szuszpendáltuk fel szintén 10^6 /ml-es koncentrációban. A méréseket egy Fluorolog-3 spektrofluoriméteren (Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ) végeztük 37°C-on. A TMA-DPH-t 352 nm-en gerjesztettük és 430 nm-en detektáltuk a fluoreszcenciáját. A fluoreszcencia anizotrópiát L-formátumban határoztuk meg.

A Laurdant 350 nm-en gerjesztettük, és emisszióját a spektrum rövidhullámhosszú tartományában 435 nm-en és a hosszúhullámhosszú tartományban 500 nm-en mértük, és a generalizált polarizációt a két intenzitás összegükre normalizált különbsége alapján számoltuk ki.

3.13. Sejtmembrán azonosítása „watershed” algoritmus segítségével konfokális mikroszkópos képeken

A sejtekről egy konfokális szeletet vettünk fel, majd a képen a felhasználó minden sejt belsejébe egy pontot („seed”) helyez el, majd ezt követően a kijelölt sejtek között az algoritmus a határokat (membránok) automatikusan megtalálja. A fenti eljárást egy általam írt, DiplImage függvényeket felhasználó Matlab programmal valósítottuk meg.

3.14. CD44 intramembrán proteolízisének kvantitatív analízise

A CD44 ellen kétféle antitest áll rendelkezésünkre. Az egyik, a Hermes-3, a CD44 extracelluláris doménjéhez, míg az anti-CD44cyto a CD44 intracelluláris részéhez kötődik. Konfokális mikroszkópos képeken a 2.9 pontban leírt módon azonosítottuk a sejtek intracelluláris terét és membránját, és összegeztük a háttérkorrigált anti-CD44cyto és Hermes-3 intenzitásokat mindkét területen. Az anti-CD44cyto/Hermes-3 hányadost használtuk a CD44 intramembrán proteolízisének jellemzésére.

3.15. Proximitás ligációs vizsgálat (PLA)

Az antitesteket 4 mg/ml-es koncentrációban 30-szoros moláris feleslegben levő szukcinimidil 4-hidrazinonikotináttal (SANH) konjugáltuk PBS-ben szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. A nem kötődött SANH-t géliszűrővel távolítottuk el. Az SANH-val konjugált antitestekhez 3,5-szeres moláris feleslegben „priming” és „non-priming” oligonukleotidokat adtunk, és három órán keresztül inkubáltuk őket szobahőmérsékleten. Az oligonukleotidokat a TriLink Biotechnologies-től szereztük be (San Diego, CA). A nem kötődött oligonukleotidokat HPLC-vel vagy géliszűrővel távolítottuk el. A kiválasztott frakciók koncentrációját gél elektroforézissel és az oligonukleotiddal konjugált antitestekkel jelölt sejtek immunfluoreszcens festésével becsültük meg.

A sejtek PLA kísérletekhez történő jelöléséhez kb. 1 millió sejtet mostunk hideg PBS-ben, majd fixáltuk őket 1% formaldehidben 10 percig jégen. Blokkolást követően a sejteket az oligonukleotiddal jelölt ún. proximitás próbákkal és fluoreszcens antitestekkel inkubáltuk 1-2 órán át 37°C-on, majd összekötő oligonukleotiddal inkubáltuk őket. Ezután a mintákat a DuoLink ligációs oldatban majd DuoLink amplifikációs oldatban inkubáltuk, és végül az amplifikációs reakció termékét Cy5-tel jelölt detektáló oligonukleotiddal vizualizáltuk áramlási citometriás vizsgálathoz.

3.16. FRAP mérések

Egy Zeiss LSM510 konfokális mikroszkópot használtunk a FRAP mérésekhez. Az eGFP fluoreszcencia intenzitásának monitorozásához az Ar ion lézer 488 nm-es vonalának teljesítményét 5%-ra állítottuk. Az eGFP fluoreszcenciájának kiégetéséhez a lézer teljesítményét 100%-ra emeltük, és a sejtmembrán egy négyszögletes területén (2×2 μm) fotoelhalványítást végeztünk. A fluoreszcencia visszatérést az 5%-ra gyengített lézerteljesítménnyel követtük nyomon. A képanalízist DiImage segítségével végeztük Matlab környezetben.

4. Eredmények és megbeszélés

4.1. Áramlási citometriás kalibrációs módszer kidolgozása kvantitatív FRET mérésekhez fluoreszcens fehérjét expresszáló sejteken

Az áramlási citometriás, intenzitás arányon alapuló FRET mérések kvantitatív végrehajtásának feltétele az α kalibrációs faktor ismerete. Az α paraméter megadja egy gerjesztett akceptor molekula FRET csatornában mért intenzitásának és egy gerjesztett donor molekula donor csatornában mért intenzitásának a hányadosát. Az α paraméter egyszerűen meghatározható, ha van két olyan minta, amiben ugyanannyi fehérje van az egyik esetben donorral, a másik esetben akceptorral megjelölve. Ezt az egyszerű módszert nem lehet fluoreszcens fehérjékkel történő FRET mérésekben alkalmazni, mert lehetetlen két olyan transzfektált (stabil vagy tranziens) sejtet előállítani, amelyek közül az egyik pontosan ugyanannyi donor fluoreszcens fehérjét fejez ki, mint amennyi akceptort a másik. Amennyiben egy olyan fúziós fehérjét állítunk elő, amelyben a donor és az akceptor egy konstrukcióban található, akkor a problémát az jelenti, hogy a kettő között FRET léphet fel, ami a fenti módszer alkalmazhatóságát kizárja. A probléma megoldására egy olyan CFP-YFP konstrukció sorozatot állítottunk elő, amelyben a két fluoreszcens fehérjét három különböző hosszúságú linker szekvencia választotta el egymástól. A FRET mérésekhez használt Becton Dickinson Facstar Plus áramlási citométeren a FRET hatásfok az alábbi egyenlettel fejezhető ki:

$$\frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \left(\frac{I_2 - S_2 I_3}{\left(1 - \frac{S_2 S_3}{S_1}\right) I_1} - S_1 \right) = \frac{1}{\alpha} R, \quad (5)$$

ahol E a FRET hatásfok, I_1 , I_2 és I_3 rendre a donor, FRET és akceptor csatornában mért intenzitások, S_1 a donornak a FRET csatornába, S_2 az akceptornak a FRET csatornába, S_3 pedig a donornak az akceptor csatornába történő átvilágításai.

A FRET hatásfok kiszámítható a donor és akceptor moláris abszorpciós koefficienseit expliciten kifejező formában is a következő egyenlet alapján:

$$\frac{F_{AD}}{R_F} = 1 + \frac{\varepsilon_D C_D}{\varepsilon_A C_A} E = R_F \quad (6)$$

ahol F_{AD} és F_A az akceptor donor jelenlétében és nélkül mért fluoreszcencia intenzitásai, ε és c a moláris abszorpciós koefficiens és a moláris koncentrációt jelentik a donorra (D alsó index) és akceptorra (A alsó index) vonatkozóan. A fenti két egyenletből meghatározható az R_I és R_F hányadosok viszonya:

$$R_F = 1 + \frac{\varepsilon_D C_D}{\varepsilon_A C_A} \frac{R_I}{\alpha + R_I} \quad (7)$$

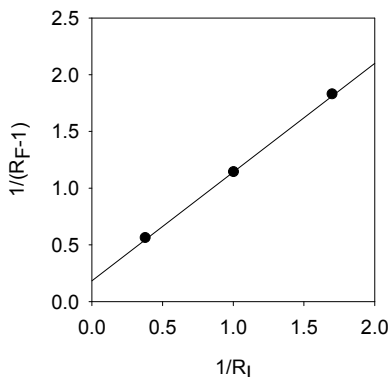
A fenti egyenlet linearizált formája felhasználható az α paraméter meghatározására:

$$\frac{1}{R_F - 1} = \frac{\varepsilon_A C_A}{\varepsilon_D C_D} \left(1 + \frac{\alpha}{R_I} \right) \quad (8)$$

Ha az $1/(R_F - 1)$ -et ábrázoljuk az $1/R_I$ függvényében, akkor az egyenes tengelymetszete $(\varepsilon_A C_A)/(\varepsilon_D C_D)$, meredeksége $\alpha \cdot \text{tengelymetszet}$ lesz.

A fenti módszerrel a három CFP-YFP konstrukció felhasználásával meghatároztuk az α paramétert (1. ábra). Megállapíthatjuk, hogy a leírt módszer megbízhatóan alkalmazható a fluoreszcens proteinekkel történő FRET mérések kalibrálására. A kvantitatív FRET mérések lehetővé teszik a FRET hatásfok kiszámítását, amely pontos fizikai jelentéssel bír és műszertől független. Ezért véleményünk szerint előnyben részesítendő az irodalomban számtalan helyen

leírt nem kalibrált FRET mérésekkel vagy fizikai jelentéssel nem bíró FRET paraméterekkel szemben.



1. ábra. Fluoreszcens fehérjékkel végrehajtott FRET mérések kalibrálása. Az abszorpciós hányados és az α paraméter meghatározása lineáris regressziós módszerrel. Az egyenes meredeksége 0,96, tengelymetszete 0,18 lett, amelyből az α értékére 5,26, az abszorpciós hányadosra 5,48 adódott.

4.2. A proximitás ligációs vizsgálat (PLA) a protein klaszterizáció szemikvantitatív mérő módszere

Bár a FRET hatások a proteinek asszociációjával kvantitatív viszonyban levő paraméter, kiszámítása magas autofluoreszcenciával rendelkező mintákon (pl. szövet metszetek) nem vagy nehézkesen végezhető el. Ezért is övezte nagy várakozás a PLA technikát, amelyről kidolgozói azt állították, hogy a PLA szignál arányos a protein asszociáció mértékével, és így hallgatólagosan azt feltételezték róla, hogy kvantitatív mérő módszerről van szó. Mivel az új technika kvantitatív képességeit még nem tesztelték, ezért célul tűztük ki, hogy ezt szisztematikus vizsgálatokkal elemezzük.

Először az ErbB2 két epitópját jelöltük meg „priming” és „non-priming” oligonukleotiddal konjugált antitesttel (pertuzumab-„priming”, trastuzumab-„non-priming”) SKBR-3 sejteken a PLA jel generálásához, amit Cy5-jelölt detektáló oligonukleotiddal vizualizáltunk. Az ErbB2 expressziós szintjét a fenti antitestekkel nem kompetáló harmadik antitesttel mértük. Áramlási citométeren megmértük a PLA jelet és az expressziós szintet jellemző antitest intenzitását, és kétdimenziós hisztogramon vizsgáltuk a kettő közötti összefüggést. Megállapítottuk, hogy magas expressziós szintek mellett a PLA jel határozott telítési effektust mutat. Ugyanezen intramolekuláris modell FRET vizsgálata során a FRET intenzitás szigorú lineáris összefüggést mutatott az expressziós szinttel, míg a FRET hatásfok nem változott.

Hogy a PLA jel telítési hajlamát egy másik független és meggyőző módon demonstráljuk, szisztematikusan variáltuk a proximitási próbák denzitását a sejtfelszínen. Ehhez a sejteket pertuzumab-„non-priming” antitesttel jelöltük meg, és a másik epitópot trastuzumab-„priming” és fluoreszcens trastuzumab antitestek keverékével jelöltük meg. Többféle mintát készítettünk, amelyekben a kétféleképpen jelölt trastuzumab antitest relatív arányát változtattuk, és így a fluoreszcens trastuzumabbal leszorítottuk a PLA jel generálásához szükséges trastuzumab-„priming” antitestet. Az eredmények újból meggyőzően arra utaltak, hogy az oligonukleotiddal jelölt proximitás próbák denzitásának emelésekor a PLA jel telítésbe fut. Ha FRET esetében változtattuk az akceptorral jelölt antitest denzitását, a FRET hatásfok szigorú lineáris tendencia szerint változott.

Tehát megállapítottuk, hogy a PLA módszer telítési effektust mutat, és ezért véleményünk szerint csak szemikvantitatív megközelítésként használható a protein asszociációk mérésére. Véleményünk szerint a sűrűn elhelyezkedő proximitási próbák által létrehozott sztérikus gátlás megakadályozhatja, hogy a PLA jelet generáló enzimek hozzáférhessenek az oligonukleotidokhoz. Ezenkívül a

PLA jel keletkezésében az RCA reakció során amplifikáció játszódik le, ami nem-lineáris hatások megjelenéséhez vezethet. Ezért a PLA mérések esetén kapott eredményeket körültekintéssel kell értelmezni.

4.3. Áramlási citometriás homo-FRET módszer kidolgozása a

membránfehérjék homoklaszterizációjának kvantitatív jellemzésére

Mivel a FRET szilárd fizikai alapokon nyugszik, lehetőség van olyan kvantitatív modellek létrehozására. A dimernél nagyobb méretű homoklaszterek vizsgálatára a homo-FRET kimondottan alkalmas, hiszen az energia szétterjed az egész klaszterben, és így a homo-FRET egyetlen manifesztációja, a fluoreszcencia anizotrópia, a klaszter méretére (tehát a benne levő fehérjék számára) érzékeny. A megoldandó problémát az jelenti, hogy a fluoreszcencia anizotrópiát nemcsak a homo-FRET befolyásolja, ezért egyetlen anizotrópia értékből nem lehet a klaszterméretre visszakövetkeztetni. Ennek megoldására dolgoztunk ki egy áramlási citometriás eljárást.

Megközelítésünk alapja, hogy egy olyan mintasorozatot állítunk elő, amelyben változik a vizsgált fehérjét jelölő fluoreszcens antitestek denzitása. Ezt úgy érjük el, hogy ugyanazon antitest fluoreszcensen jelölt és jelöletlen változatát keverjük össze, és fokozatosan változtatjuk arányukat, miközben a teljes antitest koncentráció konstans marad, és ügyelünk arra, hogy az antitestkeverék telítse a kötőhelyeket. Ebben az esetben a fluoreszcens antitest által elfoglalt építópók aránya (szaturáció, s) egyenlő a fluoreszcens antitest moláris arányával. A modellben azt tételeztük fel, hogy a fehérjék egy része monomer (arányuk mon), míg az adott típusú fehérje többi része N-mert alkot, ezek aránya: $1-mon$. A kísérleti eredmények értelmezése szempontjából lényeges, hogy minden fehérjét, amely nem képes homo-FRET kölcsönhatásban részt venni, monomernek tekintünk, tehát pl. egy fluoreszcensen jelölt fehérje, amely heterodimert alkot egy másik, nem jelölt fehérjével. Levezettük, hogy egy ilyen modellrendszerben

dc_380_12

hogyan függ a mért fluoreszcencia anizotrópia a monomerek arányától, a klaszterek méretétől és a szaturáció mértékétől:

$$\begin{aligned}
 r_{s,N} &= \frac{(1-mon) \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} \left(r_1 \frac{(1+d^6)}{1+k d^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+k d^6} \right) \right] + s \cdot mon \cdot r_1}{(1-mon) \sum_{k=0}^N \binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} + s \cdot mon} \\
 &= \frac{(1-mon)}{Ns} \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} k \left(r_1 \frac{1+d^6}{1+k d^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+k d^6} \right) \right] + mon \cdot r_1, \\
 \text{ha } r_{FRET} &= 0 \Rightarrow r_{s,N} = \frac{(1-mon)}{Ns} \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} k \left(r_1 \frac{1+d^6}{1+k d^6} \right) \right] + mon \cdot r_1
 \end{aligned}
 \tag{9}$$

A kísérletek során meghatározott anizotrópia-szaturáció párokra a (9)-es egyenletet illesztettük, amelyből meghatároztuk a monomerek arányát és a klaszterméretet. Ezek után Monte Carlo szimulációt hajtottunk végre, és az anizotrópia átlagának és szórásának ismeretében 250 véletlen adatsort állítottunk elő. Ezekre az anizotrópia-szaturáció szimulált adatsorokra szintén a (9)-es egyenletet illesztettük, így 250 darab monomer% és klaszterméret értéket állítottunk elő. A (9)-es egyenlet alkalmazásához még két paraméter értékét kellett meghatározni, az r_1 határanizotrópiát és a $d=R_0/R$ hányadost. A határanizotrópia meghatározásához hetero-FRET mintasorozatot állítottunk elő, amelyben az akceptor koncentráció növelésével változtattuk a donor fluoreszcencia élettartamát, majd a határanizotrópiát a Perrin egyenlet segítségével határoztuk meg. Az R_0/R hányadost, tehát két antitest R_0 értékekben kifejezett távolságának reciprokát, korábbi hetero-FRET mérések és az adott hetero-FRET mérésekre vonatkozó R_0 ismeretében határoztuk meg. Megállapítható, hogy az általunk kidolgozott módszer megbízhatóan alkalmazható a homo-FRET mérésre és a klaszterizáció kvantitatív jellemzésére. Mivel áramlási

citometriás méréseken alapszik, statisztikailag megbízható. Az általunk alkalmazott egyszerűsítő feltevések miatt az illesztett paraméterek száma alacsony, így gyakorlati szempontból is alkalmazható megközelítést jelent, szemben más publikált módszerekkel.

4.4. Az ErbB1 és ErbB2 homoklasztereinek vizsgálata áramlási citometriás homo-FRET módszerrel

A 3.3. pontban leírt módszerrel először az ErbB2 homoklasztereit vizsgáltuk meg SKBR-3 sejteken. Nyugálomban lévő sejteken, melyeket 0,1% szérumot tartalmazó médiumban éhezettünk egy éjszakán át, az ErbB2 ~60%-a monomer volt, de a fennmaradó hányad nagyméretű klasztereket alkotott, melyekben átlagosan ~110 ErbB2 fehérje volt. A sejtek EGF-fel vagy heregulinnal történő stimulációja a monomer%-ot nem változtatta jelentősen, de a klaszterek méretét szignifikánsan csökkentette. A változás heregulin esetében volt a nagyobb mértékű.

A kísérletet elvégeztük úgy, hogy a sejteket a növekedési faktor stimuláció előtt pertuzumabbal előkezeltük. A pertuzumab antitestről tudott, hogy az ErbB2 heterodimerizációját gátolja. A heregulin által kiváltott ErbB2 homoklaszter méretcsökkenést a pertuzumab előkezelés nagymértékben gátolta. Ez a kísérleti eredmény meggyőzően bizonyította, hogy az ErbB2 homoklaszterekből a növekedési faktor által aktivált heregulin receptor (ErbB3) ErbB2 molekulákat szakít ki.

Annak kizárására, hogy az ErbB2 nagyméretű klasztereit az antitestek által okozott keresztkötés hozza létre, a kísérleteket megismételtük monovalens Fab felhasználásával, és a bivalens antitestekkel kapott eredményekhez teljesen hasonló következtetésre jutottunk.

Ezt követően nyugálomban levő és stimulált sejteken megmértük mind az ErbB2 homoklaszterek méretét, mind az ErbB2 tirozin foszforiláltsági szintjét. Az

utóbbi a foszforilált ErbB2 és a totál ErbB2 arányával jellemeztük áramlási citometria segítségével. A két paraméter negatív korrelációt mutatott egymással, ami arra utal, hogy a nagyméretű ErbB2 homoklaszterek inaktív ErbB2-t tartalmaznak, melyekből a növekedési faktorok által aktivált más ErbB fehérjék kiszakítják az ErbB2-t.

Az ErbB1 receptort A431 sejteken jellemeztük, mivel ezen a sejten expresszálódik ez a fehérje kellően magas szinten a homo-FRET mérések elvégzéséhez. Nyugalomban levő sejteken az ErbB1 ~90%-a monomer volt, míg a fennmaradó hányad viszonylag kisebb méretű klasztereket alkotott, amelyekben átlagosan ~4 ErbB1 volt. EGF stimuláció hatására az ErbB1 monomer%-a csökkent, és az átlagos klaszterméret növekedett. Ez a változás ellentétes az ErbB2 fentebb leírt viselkedésével, de összhangban áll az irodalmi adatokkal. A két ErbB fehérje jelentősen eltérő viselkedése felhívja a figyelmet arra, hogy a tankönyvi dogmaként tárgyalt elmélet, mely szerint az aktiválatlan receptor monomer, amely aktiváció hatására asszociálódik, nem tartható. A különféle módszerek alkalmazása alapján az ErbB receptorok hierarchikus asszociációjára felállított modellünk a 3.9 fejezetben kerül ismertetésre.

4.5. FRET-szenzitizált akceptor fotoelhalványítás (FSAB) a fehérjék heteroklaszterizációjának kvantitatív jellemzésére

A heteroklaszterek tanulmányozására a fent kidolgozott homo-FRET módszer nem alkalmas. Bár több eljárás is képes arra, hogy a heteroklaszterizációt kvantitatív módon jellemezze, ezek általában nem alkalmazhatók hagyományos konfokális mikroszkópon. Ezért célul tűztük ki egy ilyen módszer kifejlesztését és tesztelését.

Módszerünk az 1990-es években Mekler és mtsai által kidolgozott eljárásan alapul. Eszerint az akceptor tetszőleges fotokémiai folyamatát hetero-FRET segítségével elő lehet segíteni. Az akceptor vizsgált fotokémiai reakciója

lehet a fotoelhalványítása is. Ebben az esetben a FRET abban nyilvánul meg, hogy az akceptor fotoelhalványítási kinetikája felgyorsul a donor jelenlétében, ha a gerjesztést a donor abszorpció maximumán végezzük. A jelenség akkor mérhető könnyen, ha fotolabilis akceptor mellé fotostabil donort választunk. A folyamat felhasználható a donorral komplexben levő akceptorok arányának meghatározására is. Hangsúlyozandó, hogy a módszer a FRET által megnövelt akceptor fotoelhalványításon alapszik, elneveztük FRET szenzitizált akceptor fotoelhalványításnak („FRET-sensitized acceptor bleaching”, FSAB).

A módszer matematikai bevezetése során feltételeztük, hogy a donorral való kölcsönhatás szempontjából kétféle akceptor populáció létezik: 1) donorhoz kötött akceptor molekulák, tehát amelyek FRET távolságon belül vannak a donoroktól (A_{bound}); 2) szabad akceptorok (A_{free}). Mivel praktikusán minden esetben a szabad akceptorok egy része is kiég a donor gerjesztési hullámhosszán, ezért ezt korrekcióba kell venni. A szabad akceptorok kiégett hányadát BCF -nek („bleaching correction factor”) neveztük. A BCF értékét abban a pillanatban kell meghatározni, amikor a kötött akceptorok 100%-a kiég, tehát amikor a FRET hatásfok nullára csökken. A fentiek értelmében fel lehet írni a következő egyenletrendszer:

$$F_{\text{bleached}} = \frac{A_{\text{free}} BCF + A_{\text{bound}}}{A_{\text{free}} + A_{\text{bound}}}, \quad A_{\text{bound}} + A_{\text{free}} = A_0 \quad (10)$$

ahol F_{bleached} a kiégett akceptorok hányadát jelenti. Ezek alapján a kötött akceptorok arányát a következőképpen lehet megadni:

$$\frac{A_{\text{bound}}}{A_0} = \frac{F_{\text{bleached}} - BCF}{1 - BCF} \quad (11)$$

A módszer alkalmazhatóságának igazolására először egy olyan donor-akceptor párt kellett találnunk, amelyben a donor sokkal fotostabilabb, mint az akceptor. A Cy5 közismerten relatíve gyors fotoelhalványítási kinetikája és az a

tény, hogy Mekler és mtsai is cianin típusú festékeket használtak, arra utalt, hogy ez a flouorofór jó választás lesz akceptornak. Mivel azonban a Cy5 kiégése praktikus szempontból még így is túl lassú, CBr_4 -ot használtunk a kiégetés felgyorsítására, hiszen a CBr_4 a cianin festékekkel töltésátviteli komplexet alkotva felgyorsítja azok fotoelhalványítását. CBr_4 jelenlétében az AlexaFluor546 megőrzi fotostabilitását, ellentétben a fluoreszcens kvantum dotokkal. Ezért az FSAB kísérletekhez az AlexaFluor546-Cy5 donor-akceptor párt használtuk.

Az FSAB módszer biológiai alkalmazása előtt igazoltuk, hogy a donorhoz közeli akceptorok preferenciálisan kiégnek a donor gerjesztése esetén. Ezen kísérletből még azt is meghatároztuk, hogy ~200 sec szükséges ahhoz, hogy a donoroktól FRET távolságra levő akceptorok teljesen kiégjenek, hiszen ekkorra csökkent a FRET hatásfok nullára. Még mielőtt az FSAB technikát az ErbB1-2 heteroklaszterek vizsgálatára használtuk volna, ellenőriztük, hogy a 3.3-3.4. fejezetekben kidolgozott és alkalmazott homo-FRET mérésekhez hasonló eredményeket szolgáltat-e az ErbB1 és ErbB2 homoklasztereire. Az FSAB módszer szerint az ErbB1 13%-a, míg az ErbB2 83%-a van homoklaszterben stimulátatlan SKBR-3 sejtek felszínén, ami jó egyezést mutat a homo-FRET kísérletek eredményeivel.

4.6. Az ErbB1 és ErbB2 heteroklaszterizációjának kvantitatív jellemzése

FSAB módszerrel

Az előző fejezetben bemutatott FSAB módszer segítségével kvantitatív analízisnek vetettük alá az ErbB1 és ErbB2 heteroklaszterizációját nyugalomban levő és EGF stimulált SKBR-3 sejteken. Olyan sejtekben, amelyeket egy éjszakán át alacsony szérumtartalmú médiumban tenyésztettünk, az ErbB1 ~40%-a alkotott heteroasszociátumot az ErbB2-vel, míg az ErbB2 ~10% volt heteroklaszterben az ErbB1 molekulákkal. A nyugalomban levő sejtek után megvizsgáltuk az ErbB1-2 heteroasszociációt EGF stimulált sejteken. Az ErbB2 heteroklaszterizációt mutató

hányada ~2-szeresére növekedett EGF kezelés hatására, míg az ErbB1 heteroasszociáló hányada nem változott jelentősen. Értelmezésünk szerint ennek oka az, hogy az EGF nemcsak ErbB1 homoasszociációt, hanem ErbB1-2 heteroasszociációt is kivált, ezért az ErbB1 heteroasszociáló hányada nem változik. A 3.4 fejezetben ismertetett homo-FRET mérések szerint az ErbB2 nyugalomban tekintélyes méretű homoasszociátumokat alkot, melyekből EGF stimuláció hatására a növekedési faktor által aktivált ErbB1 proteinek ErbB2-t szakítanak ki. Ezt a feltételezést az FSAB mérések alátámasztották, hiszen az ErbB2 ErbB1-gyel heteroklasztert formáló hányada tényleg szignifikánsan nőtt EGF stimulációt követően.

Az FSAB módszerrel lehetőségünk nyílt arra is, hogy a heteroklaszterek átlagos relatív összetételét, sztöchiometriáját megbecsüljük. Ehhez meg kellett határozni az egyes sejtek által kifejezett ErbB1 és ErbB2 molekulák számát. Méréseink szerint stimulálatlan sejtekben az ErbB1-2 heteroklaszterekben az ErbB1 és ErbB2 arány ~1:1,5, és ez ~1:4-re nő EGF stimuláció hatására. Összegzésképpen megállapíthatjuk, hogy az FSAB módszer betekintést nyújt a receptorok által alkotott heteroklaszterek összetételébe, és az általa szolgáltatott eredmények a homo-FRET kísérletekkel összhangban vannak.

4.7. Az ErbB1 homoasszociációjának vizsgálata konfokális mikroszkópos

N&B módszerrel

A különböző, a fehérje asszociációkat karakterizáló technikák a klaszterizáció különböző dimenzióit jellemzik. Ezért bár a 3.4. fejezetben részletesen leírtuk az ErbB1 és ErbB2 receptorok homoasszociációit, egy másik módszerrel, a N&B analízissel is szeretnénk volna megerősíteni, ill. más távolságtartományban jellemezni ezeket a klasztereket. Másrészt többféle sejtvonal segítségével arra is választ szeretnénk volna kapni, hogy a fehérjék expressziós szintje hogyan befolyásolja az asszociátumokat.

Az ErbB1 fehérje homoklasztereinek vizsgálatához ErbB1-eGFP-vel stabilan transzfektált sejtvonalakat használtunk. Először a magas expresszióval rendelkező daganatsejtek modelljének tekinthető F1-4 sejtet vizsgáltuk, amely $\sim 6 \cdot 10^5$ ErbB1 fehérjét fejez ki. A stimulálatlan, szérum éheztetett sejtek molekuláris fényesség értéke magasabb volt, mint a szolubilis, monomer eGFP-jé, ami arra utal, hogy az ErbB1 fehérje már stimulálatlan állapotban sem tisztán monomerként van jelen F1-4 sejtek membránjában. 100 nM EGF a molekuláris fényességet a dimerekre jellemző értékre emelte, miszerint a növekedési faktor a teljes receptor populáció dimerizációját kiváltotta.

Ezt követően két alacsonyabb ErbB1-eGFP expresszióval rendelkező sejten (F1-10, HeLa-ErbB1eGFP) végeztük el a N&B analízist, amelyek jobban modellezzik a fiziológias ErbB1 expressziós szinteket. Az F1-10 és HeLa-ErbB1eGFP sejtek $\sim 5 \cdot 10^4$ és $\sim 2 \cdot 10^5$ ErbB1-eGFP-t fejeznek ki. Mindkét sejtvonal szérum éheztetése után az ErbB1-eGFP molekuláris fényessége arra utalt, hogy a fehérje tisztán monomerként volt jelen. EGF stimuláció hatására az ErbB1 receptor asszociáció mértéke szignifikánsan növekedett. Stimulált F1-10 sejteken a molekuláris fényesség eloszlása aszimmetrikus volt. Az EGF stimulált F1-10 sejtek fényesség eloszlását három Gauss görbével tudtuk, illeszteni, és a legjobboldalibb csúcs átlagos fényessége pentamerek jelenlétére utalt. A kolokalizációs analízis azt mutatta, hogy ezen magas molekuláris fényességű pixelek eloszlása a klatrinéval korrelál.

4.8. Az ErbB2 homoasszociációjának vizsgálata konfokális mikroszkópos

N&B módszerrel

Az ErbB2 homoklasztereinek vizsgálatát szérum éheztetett A4erbB2 sejtekkel kezdtük, melyek $\sim 1,2 \cdot 10^6$ ErbB1-et és $\sim 9,5 \cdot 10^5$ ErbB2-mYFP-t fejeznek ki. Stimulálatlan A4erbB2 sejtek membránjában az ErbB2 mind mikroszkópos, mind molekuláris szinten jelentős klaszterizációs hajlamot mutatott. A mikroszkópos

képen látható klasztereket, a molekuláris asszociátumoktól elkülönítendő, makroklasztereknek neveztük el. Az ErbB2-mYFP molekuláris fényessége szignifikánsan magasabb volt a makroklaszterekben, mint azokon kívül, de mindkét helyen arra utaltak a mérések, hogy az ErbB2 nem monomerként található. A monomer mYFP molekuláris fényességével összehasonlítva a makroklasztereken kívül ~3, azokon belül ~6 ErbB2 alkotott egy molekuláris asszociátumot stimulálatlan A4erbB2 sejteken. Az ErbB1 homoasszociációs hajlamához képest az ErbB2 nagyobb méretű asszociátumokat mutatott. Ez a tendencia összhangban van a homo-FRET mérésekkel kapott eredményekkel.

Számtalan oka lehet az ErbB2-mYFP ErbB1-hez képest magasabb homoasszociációs hajlamának: (i) a C-terminális PDZ kötő régió; (ii) az mYFP-t az ErbB2-höz kapcsoló linker szekvencia; (iii) az mYFP csoport. Ezen lehetőségek megvizsgálásához négy új fúziós fehérjét állítottunk elő: ErbB2-short-mYFP, amelyben az mYFP és az ErbB2 között egy dipeptid linker van; ACP-ErbB2, amelyben az ErbB2-höz egy Sfp transzferázzal jelölhető ACP szekvenciát kötöttünk C-terminálisan (tehát extracellulárisan); valamint mindkét szekvencia VPV deléció mutánsát. A VPV szekvencia felelős a PDZ doménnel rendelkező fehérjék megkötéséért. Mivel mind a négy ErbB2 variáns az előzőekben leírt makro- és mikroklaszterizációt mutatta, levonható az a következtetés, hogy az ErbB2 N&B kísérletekben mutatott jelentős homoklaszterizációs hajlama a molekula saját tulajdonsága, amely nem a PDZ kötő doménhez köthető.

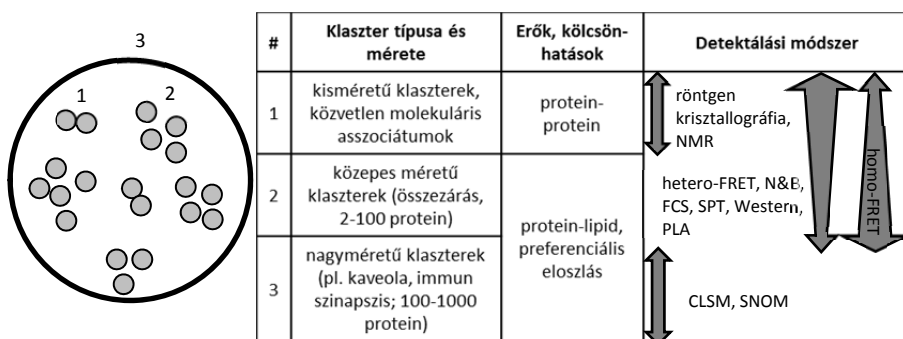
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az ErbB2 makroklaszterek milyen más membránfehérjével mutatnak kolokalizációt. Az egyetlen pozitív eredményt szolgáltató fehérje a caveolin volt, amellyel az ErbB2 közepesen erős korrelációt mutatott ($r=0.5$). Bár kvantitatív analízissel nem igazoltuk, feltűnő volt, hogy a caveolin rendszerint az ErbB2 makroklaszterek perifériáján helyezkedett el.

Végezetül megvizsgáltuk, hogy A4erbB2 sejtek EGF stimulációja milyen hatást gyakorol az ErbB2 homoklasztereire. Eredményeink szerint az EGF hatására a makroklaszterekben szignifikánsan csökkent az ErbB2 homoklaszterek mérete, míg a makroklasztereken kívül nem volt jelentős változás. Pertuzumabbal előkezelt sejtekben az EGF indukálta változások nem jelentek meg, ami arra utal, hogy az EGF által aktivált ErbB1 heterodimerizációja hatására csökken az ErbB2 homoklaszterek mérete. Ezek az eredmények is összhangban vannak az ErbB2 homo-FRET-tel történt karakterizálásával.

4.9. Az ErbB fehérjék hierarchikus klaszterizációjának modellje

A 3.3-3.8. fejezetekben az ErbB1 és ErbB2 klaszterizációjának számtalan aspektusa került tárgyalásra, amely alapján megalkotható egy modell, amely a receptorok asszociációját több hierarchikus szinten tárgyalja. A modell legfontosabb üzeneteit a 2. ábra foglalja össze.

A fehérje klaszterizáció legalacsonyabb szintjét a közvetlen molekuláris



2. ábra. A membránfehérjék és a vizsgáló eljárások hierarchikus modellje.

A klaszterizáció egyes szintjeinek bővebb magyarázatát lásd a szövegben (összezárás=„co-confinement”). A detektálási módszerek oszlopban a nyilak vastagsága az egyes módszerek adott klaszterizációs szint kimutatására való érzékenységevel arányos, amelyet részletesen az 1.6. fejezet tárgyal.

interakciók jelentik. Ezeket az asszociátumokat közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások tartják össze, és legfontosabb és legelterjedtebb képviselőjük a dimer, de minden valószínűség szerint nagyobb méretű oligomerek is léteznek még ezen osztályon belül. Az átmenet a közepes méretű klaszterek felé folytonos. A klaszterek ezen osztályát már inkább lipid mediálta interakciók, de kisebb részben még a közvetlen protein-protein kölcsönhatások is fenntartják. A lipid mediálta interakciókban a proteinek elsősorban a transzmembrán doménjeikkel vesznek részt. Ezenkívül ide kell még sorolni az összezárt („co-confined”) proteineket is. Az ErbB2 molekula homo-FRET és N&B módszerrel kimutatott „nagy méretű” klaszterei ebbe az asszociációs szintbe tartoznak. Az ErbB1 EGF által kialakított dimerei a kisméretű klaszterek közé tartoznak, de preformált asszociátumairól ez nem mondható el bizonyossággal.

A klaszterizáció harmadik hierarchikus szintjét a nagy méretű asszociátumok alkotják. Ezek már fénymikroszkóppal is látható objektumok, és több száz vagy ezer fehérjét tartalmaznak. Érdeemes megjegyezni, hogy Kusumi és mtsai a plazmamembrán doménszerkezetének elemzése kapcsán az itt javasolt háromszintű klaszterizációs modellhez sokban hasonló elképzelést vázoltak fel.

Az egyes asszociációs szintek biológiai szerepei eltérőek. A kisméretű klaszterek (főleg dimerek) egyértelműen a receptor aktiváció alapegységeinek tekinthetők, míg a közepes és nagy méretű klaszterek inkább platformot teremtenek a kisméretű asszociátumok létrejöttének finomhangolására. Így pl. a közepes és nagy méretű asszociátumokon belül megnő a receptorok denzitása, ami elősegíti a dimerizációt és aktivációt. Az ErbB2 esetében ennek inkább ellenkezője igaz, hiszen a közepes méretű ErbB2 klaszterek inaktív ErbB2 molekulák rezervoárjaként működnek.

4.10. A lipid tutajok és az ErbB3 hatása az ErbB2 homoklaszterizációjára

Az előzőekben ismertetett eredmények feltárták, hogy az ErbB fehérjék milyen klasztereket alakítanak ki. Az 3.9. fejezetben körvonalazott modell alapján ezek létrejöttében nemcsak közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások, hanem a lipid környezet hatásai is szerepet játszanak. Ezért megvizsgáltuk, hogy az ErbB2 esetében ebben van-e szerepe a lipid tutajoknak. Először azt kellett eldönteni, hogy az ErbB2 receptor a lipid tutajokban helyezkedik-e el. Erre a kolera toxin B alegységének (CTX-B) fluoreszcensen jelölt változatával történő vizsgálatokat választottuk. Eredményeink szerint az ErbB2 és a lipid tutajokat jelölő CTX-B fluoreszcenciája korrelált egymással. A kolokalizáció kvantitatív jellemzésére a Manders koefficienszt használtuk. Eszerint az ErbB2 és a lipid tutajok közötti átfedés $77\pm6\%$ -os volt akár az ErbB2-t, akár a CTX-B jelet használtuk referenciának. A konfokális mikroszkópos képek egyértelműen bizonyították azt is, hogy az ErbB2 mikroszkóppal is látható klasztereket alkot, amelyek megfelelnek az előző fejezetekben leírt „makroklasztereknek”. Mivel ezekben a makroklaszterekben az ErbB2 lokális denzitása sokkal nagyobb, mint a plazmamembrán többi részén, a tömeghatás törvénye alapján az várható, hogy a makroklaszterekben az ErbB2 homoasszociációjának mértéke nagyobb lesz. FRET mérések azonban arra utaltak, hogy a klaszterekben található magas ErbB2 denzitis ellenére nem nagyobb az ErbB2 homoasszociáció mértéke a klasztereken belül, mint kívül.

Ezen eredmények arra utaltak, hogy a makroklaszterekben valamilyen tényező gátolja az ErbB2 homoasszociációját. Ezért akceptor fotoelhalványításon alapuló FRET segítségével megmértük a pixelenkénti FRET-et ErbB2 homoasszociációra. Tapasztalatunk szerint az ErbB2 homoasszociáció mértéke negatív korrelációt mutat a lipid tutajokban, a CTX-B által megjelölt GM1 gangliozidok denzitásával. Ezen eredményeink összhangban vannak a gangliozidok

ErbB1 asszociációra gyakorolt negatív hatásával és a homo-FRET mérések alapján felállított azon hipotézisünkkel, hogy a közepes vagy nagyméretű ErbB2 homoklaszterekben az ErbB2 inaktív formában van jelen.

A lipid környezet hatásán kívül minden olyan fehérje, amely az ErbB2-vel kölcsönhat, képes lehet arra, hogy kompetíció révén gátolja az ErbB2 homoasszociációját. Az SKBR-3 sejtek az ErbB2 legfontosabb heterodimerizációs partnerét, az ErbB3-at is kifejezik. Mikroszkópos FRET méréseink arra utaltak, hogy az ErbB2 homoasszociációja arányos az ErbB2 lokális expressziós szintjével, és negatív korrelációt mutat az ErbB3 lokális denzitásával. Mindkét összefüggés a tömeghatás törvényének érvényesülését bizonyítja az ErbB2 homoasszociációja esetében.

A lipid tutajokban többféle különböző típusú fehérje fordul elő. Ezek közül az egyik a GPI-horgonyzott proteinek osztálya, melyekről kimutatták, hogy a pentamer CTX-B által okozott lipid tutaj keresztkötés hatására nagyobb méretű foltokba koncentrálnak a CTX-B-vel együtt. Megvizsgáltuk, hogy ez a stabil lipid tutaj asszociáció az ErbB2 esetében is felismerhető-e. SKBR-3 sejteket kezeltünk fluoreszcensen jelölt CTX-B-vel 37°C-on, majd megjelöltük őket fluoreszcens anti-ErbB2 antitestekkel. A konfokális mikroszkópos felvételek tanúsága szerint a keresztkötött lipid tutajok hátrahagyták az ErbB2-t. A kvantitatív analízis szerint a Manders koefficiens a CTX-B kezelés $28 \pm 5\%$ -re csökkentette. Eszerint a GPI-kötött fehérjékkel ellentétben az ErbB2, és elképzelhető, hogy más transzmembrán fehérjék is, kevésbé statikusan kötöttek a lipid tutajokhoz.

4.11. Lipid tutajok CTX-B-vel való keresztkötésének hatása az ErbB2 biológiai funkcióira

Mivel a lipid tutajok CTX-B-vel történő keresztkötése jelentősen módosította az ErbB2 klaszterek eloszlását, ezért célszerűnek tűnt megvizsgálni, hogy ez milyen hatásokat váltott ki az ErbB2-höz köthető biológiai válaszokra.

Először az ErbB2 trastuzumab által indukált internalizációját és leszabályozódását („down-regulation”) vizsgáltuk meg. Az eredmények szerint CTX-B előkezelt sejteken mind az ErbB2 internalizációja, mind leszabályozódása jelentősen lelassult. A trastuzumab antiproliferatív hatását a CTX-B előkezelés növelte. Ugyanezen sejteken megvizsgáltuk az ErbB2 expressziós szintjét, és azt tapasztaltuk, hogy a trastuzumab önmagában jelentősen csökkentette az ErbB2 szintet a sejtekben, de a CTX-B-vel történő együttkezelés során ez tovább nem csökkent. A fenti eredmények azért voltak rendkívül érdekesek, mert akkoriban a trastuzumab hatásmechanizmusának az ErbB2 leszabályozódását tekintették. Eredményeink szerint azonban a CTX-B kezelés következményei a trastuzumab antiproliferatív és ErbB2 leszabályozó indukáló hatásaira nem korreláltak egymással, hiszen a CTX-B a trastuzumab rövidtávú, ErbB2 leszabályozódást kiváltó hatását csökkentette, antiproliferatív hatását viszont növelte. Ezért levontuk azt a következtetést, hogy a trastuzumab antiproliferatív hatását valószínűleg nem az ErbB2 leszabályozása által fejtí ki.

Végül megvizsgáltuk, hogy az ErbB2 heregulin általi stimulációjára milyen hatással van a CTX-B előkezelés. Eredményeink szerint a heregulin a várakozásoknak megfelelően mind az ErbB2, mind a Shc tirozin foszforilációját növelte, és ezt a hatást a CTX-B előkezelés meggátolta. Ezen változás összhangban van a CTX-B kezelésnek az ErbB2-3 heteroasszociációra kifejtett hatásával, hiszen a CTX-B ezt is csökkentette (FRET hatásfok az ErbB2-3 heterodimerre kontroll mintákban: $19,7 \pm 0,9\%$; ugyanez CTX-B előkezelt mintákban: $7,3 \pm 2,1\%$). A fenti eredmények arra utalnak, hogy a lipid tutajok lipid környezete az ErbB2 homoasszociációt csökkenti, de az ErbB2-3 heteroklaszterizációt és a heregulin által kiváltott biológiai hatásokat valószínűleg elősegíti. Bár pontos magyarázat a homo- és heteroasszociációk eltérő lipid környezet érzékenységre nincs,

valószínű, hogy a transzmembrán domének ezen asszociációs formák fenntartásában betöltött eltérő szerepe lehet a jelenség hátterében.

4.12. Az ErbB fehérjék expressziója nincs hatással sejtek elisidepsin iránti érzékenységre

Az előző fejezetekben a lipid tutajok szerepe a transzmembrán jelátvitel és a fehérje asszociációk szemszögéből került tárgyalásra. A következőkben bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a lipid tutajok gyógyszerhatás szempontjából is fontosak, hiszen az elisidepsin nevű kísérleti kemoterápiás szer támadáspontja a sejtmembrán, valószínűleg a lipid tutajok. Az elisidepsin egy tengeri puhatestűből (*Elysia rufescens*) izolált ciklikus depsipeptid, melynek hatásmechanizmusa nagyrészt ismeretlen volt vizsgálataink megkezdésekor, de voltak arra mutató kísérleti eredmények, hogy a lizoszómális membrán károsítását okozza, és hatásossága korrelációt mutatott az ErbB fehérjék, különösen az ErbB3, expressziójával.

Vizsgálataink elején azt ellenőriztük, hogy az ErbB fehérjék expressziójának valóban meghatározó szerepe van-e az elisidepsin hatásában. Először CHO sejtekben, ill. ennek ErbB2-vel és ErbB3-mal stabilan transzfektált variánsaiban mértük meg az elisidepsin IC50 értékét a gyógyszer hosszútávú hatása alapján, és nem kaptunk szignifikáns különbséget az eltérő ErbB2 és ErbB3 expressziójú sejtvonalak között. Hasonlóan nem tapasztaltunk semmilyen változást az ErbB2 vagy ErbB3 transzfekció után a sejtek rövidtávú elisidepsin érzékenységében.

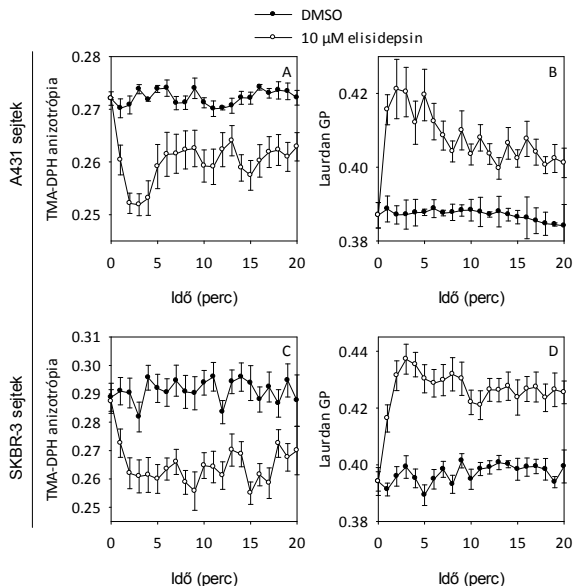
Még két további kísérletsorozatot végeztünk az ErbB fehérjék elisidepsin-érzékenységet befolyásoló hatásának vizsgálatára. Egyrészt ErbB1, ErbB2 vagy ErbB3 fehérjékkel stabilan transzfektált A431 sejtek elisidepsin iránti érzékenységét hasonlítottuk össze az eredeti sejtvonalával. Másrészt A431 és SKBR-3 sejteken az ErbB3 expresszióját RNS interferenciával gátoltuk. Mindkét kísérlet azt a következtetést erősítette meg, hogy az ErbB1-3 fehérjéknek nincsen

jelentős hatásuk az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában, és cáfolták a korábbi, erre utaló kísérleti eredményeket. Feltételezésünk szerint a korábbi kísérletekben az ErbB expresszió és az elisidepsin érzékenység közötti gyenge korreláció alapján vonhattak le téves következtetéseket.

4.13. Az elisidepsin elsődleges támadáspontja a sejtmembrán

Bár az előzőekben ismertetett eredmények meggyőzően cáfolták, hogy az ErbB fehérjék bármilyen szerepet játszanak az elisidepsin iránti érzékenység meghatározásában, a gyógyszer valódi támadáspontja továbbra is ismeretlen maradt. Az elisidepsin gyors hatása arra utalt, hogy esetleg a plazmamembrán lehet a támadáspont. Ezért megvizsgáltuk, hogy milyen hatása van az elisidepsinnek lipid tutaj markerek eloszlására. Mind exogén (GPI-kötött GFP), mind endogén (placentáris alkalikus foszfatáz) lipid tutaj markerek vizsgálata esetén azt tapasztaltuk, hogy az elisidepsin átrendezte a fehérjék eloszlását: diffúz intracelluláris, néhol vezikuláris és nukleáris lokalizáció volt felismerhető.

Az olyan gyógyszerek, amelyek támadáspontja a sejtmembrán, gyakran okoznak átalakulást a membrán fluiditásában vagy rendezettségében. A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája a membrán fluiditásáról, míg a Laurdan generalizált polarizációja (GP) a membrán hidratáltságáról, ill. rendezettségéről ad információt. Az A431 és az SKBR-3 sejteken az elisidepsin 1-2 perc alatt jelentős csökkenést indukált a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiájában, míg a Laurdan GP-jában ezzel ellentétes irányú változást okozott (3. ábra). A két paraméter ellentétes irányú változása arra utal, hogy olyan strukturális átalakulás történt, amely a rendezettséget és a fluiditást is növelte. Ez több közlemény alapján a folyékony rendezetlen doménekre, azaz a lipid tutajokra jellemző (125, 233). Az a tény, hogy a membrán szerkezetében feltárt fenti változásokat az elisidepsin 1-2 perc alatt kiváltja, arra utal, hogy ez ténylegesen a gyógyszer elsődleges hatása, és a többi változás ennek a következménye lehet.



3. ábra. Elisidepsin által indukált változások a plazmamembrán struktúrájában. A TMA-DPH anizotrópiájában és a Laurdan generalizált polarizációjában 10 μM elisidepsin által kiváltott változásokat követtük fluoriméteren SKBR-3 és A431 sejteken. Kontrollként az elisidepsin oldószerét, DMSO-t használtuk. Az ábrán három független mérés eredményének átlaga ($\pm\text{SEM}$) látható.

4.14. Az ErbB2 és ErbB3 koexpresszió hatása ErbB1 ligand indukált internalizációjára

Az ErbB2, és esetleg az ErbB3, koexpresszió gátolja az ErbB1 EGF által kiváltott leszabályozódását, de a hatás módjával kapcsolatban ellentmondó eredmények láttak napvilágot. Először fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk az ErbB1 EGF által kiváltott internalizációját. A sejtek stimulálásához streptavidin-QDot-hoz kapcsolt biotinált EGF-et használtunk (EGF-QDot). A komplexben az EGF:QDot molarány 6:1 volt. A sejteket intenzitás alapú küszöböléssel jelöltük ki a

fluoreszcens proteineknek megfelelő képeken, és az így azonosított egyedi sejtek határát tekintettük a sejtmembránnak. Ezt befelé megvastagítottuk 3-10 pixellel, és az így előálló területet használtuk membrán maszkként. Az ettől a területtől további 15-35 pixellel befelé elhelyezkedő területet pedig intracelluláris maszkként használtuk. Kiszámoltuk az internalizált fluoreszcens protein relatív arányát az internalizált QDot relatív arányához képest. Eredményeink szerint az EGF-QDot jelentős mértékű ErbB1 internalizációt váltott ki mind F1-4, mind A4erbB1 sejteken. Az EGF-QDot által aktivált endogén ErbB1 kisebb mértékben kiváltotta az ErbB2-mYFP internalizációját is. Azt, hogy ez az ErbB1-ErbB2 heterodimerizáció következménye volt, 2C4 előkezeléssel bizonyítottuk, amely az ErbB2 heterodimerizációjának gátlásával teljesen blokkolta az EGF-QDot indukálta ErbB2 internalizációt. Az endogén ErbB1-gyel koexpresszált ErbB3-citrine, valószínűleg az ErbB1-3 heterodimerek gyenge képződésének köszönhetően, nem mutatott internalizációt EGF-QDot stimulációt követően.

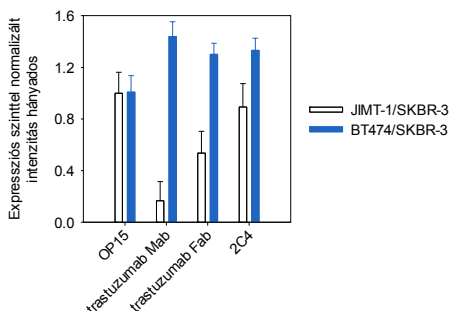
Ezt követően megmértük az EGF-QDot internalizációját a 2.9. fejezetben leírt savas mosásos protokoll alapján. A mikroszkópos eredményekkel összhangban az EGF-QDot jelentős mértékű ErbB1 internalizációt váltott ki, amelyet az ErbB2 koexpresszió gátolt. Az ErbB2 hatását 2C4 előkezeléssel gátolni lehetett, hiszen a 2C4 antitest blokkolja az ErbB2-t magába foglaló heterodimerek létrejöttét. Az ErbB3 koexpresszióknak nem volt jelentős hatása az EGF-QDot internalizáció sebességére. A fenti eredmények arra utaltak, hogy az ErbB2 koexpresszió az ErbB1-2 heterodimerek képződése révén gátolja az ErbB1 EGF által indukált internalizációját, de még jelentős mennyiségű ErbB3 kifejeződésének sincs számottevő hatása erre.

4.15. A trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteken a MUC4 transzmembrán mucin maszkírozza az ErbB2-t

A trastuzumabot elsősorban ErbB2-t fokozottan kifejező emlőtumорок

ellen használják, és bár jelentős terápiás előnyt jelent a konvencionális kemoterapikumokkal szemben, a rezisztencia jelentős kihívást jelent. Ennek karakterizálására egy trastuzumab rezisztens sejtvonalat (JIMT-1) használtunk, amely *in vitro* is megőrizte ezen tulajdonságát. A vizsgálataink évei előtt körvonalazott elképzelések szerint a trastuzumab hatásmechanizmusa mögött az antitest indukálta ErbB2 leszabályozódás, a rezisztencia mögött pedig az ErbB2 expresszió elvesztése áll. Ezért ellenőriztük, hogy az ErbB és IGF1R expressziók, trastuzumab indukálta ErbB2 internalizáció és leszabályozódás tekintetében van-e különbség a JIMT-1 sejtvonal és más, trastuzumab szenzitív sejtvonalak között. Eredményeink szerint a paraméterek között nem volt olyan mértékű különbség, amely a biológiai válaszok eltérését magyarázhatta volna.

Felmerült bennünk az, hogy bár az ErbB2 intracelluláris részéhez kötődő antitest (OP15) segítségével meghatározott expressziós szint tekintetében a JIMT-1 sejtek nem különböztek jelentősen a vizsgált szenzitív sejtvonalaktól, a trastuzumab kötődés mégis gátolt lehet. Ezért megvizsgáltuk a különböző ErbB2 epitópok elérhetőségét különböző sejtvonalakon. Eredményeink szerint a membránhoz proximálisan kötődő trastuzumab antitest jelentősen kisebb mértékben kötődött a JIMT-1 sejtekhez, mint a szenzitív SKBR-3 vagy BT474 sejtvonalakhoz. Az epitóp maszkírozása jelentős mértékben csökkent, ha teljes antitest helyett a trastuzumab Fab fragmentumával jelöltük a sejteket, és jelentősen kisebb mértékű volt abban az esetben is, ha az ErbB2-t a membrántól disztálisan kötődő 2C4 antitesttel jelöltük (4. ábra).



4. ábra. A trastuzumab kötő epitóp maszkírozása JIMT-1 sejteken.

Az ábrán feltüntetett antitestek kötődését elsődleges vagy másodlagos immunfluoreszcens módszerrel mértük meg áramlási citometria segítségével. A JIMT-1/SKBR-3 és JIMT-1/BT474 hányadosokat az ErbB2 törtben szereplő két sejten mérhető expressziós hányadosával normalizáltuk, így a kapott hányados az antitest vagy Fab két sejthez való relatív kötődét fejezi ki.

Az eredmények alapján nyilvánvaló volt, hogy valamilyen faktor gátolja a trastuzumab sejtekhez kötődését. A tény, hogy az antitest molekulatömegének harmadával rendelkező Fab és a membrántól távolabb kötődő 2C4 antitest kötődését az ismeretlen faktor nem vagy csekélyebb mértékben gátolta, egyértelműen a membránban jelen lévő sztérikus gátló hatásra utalt. Feltettük, hogy ebben a gátló hatásban a MUC-4 transzmembrán mucin játszik szerepet. Igazoltuk, hogy a MUC4 mind mRNS, mind fehérje szinten magasabb szinten expresszálódik a JIMT-1 sejteken, mint trastuzumab szenzitív sejtvonalakon. Ezt követően a JIMT-1 sejteken immunfluoreszcensen megfestettük a MUC4-et és az ErbB2-t trastuzumabbal jelöltük. A MUC4 expresszió és a trastuzumab kötődése között határozott negatív korrelációt találtunk, ami arra utalt, hogy a MUC4 ténylegesen gátolja a trastuzumab ErbB2-höz való kötődését.

A MUC4 maszkírozásban betöltött szerepét RNS interferenciával bizonyítottuk be. Bár a JIMT-1 sejteknek csak kb. 15%-át sikerült transzfektálni, a

transzfektált szubpopulációban a MUC4 ellenes siRNS-sel hatékonyan gátoltuk a MUC4 expressziót. A MUC4 siRNS-sel kezelt JIMT-1 sejteket a transzfekeciót követően két nappal fluoreszcens trastuzumabbal festettünk meg, és a magas trastuzumab kötődést mutató szubpopuláció mérete jelentősen megnőtt. A növekmény nagysága megfelelt a MUC4 ellenes siRNS-sel transzfekektált populáció arányának (~15%). A transzfekektált mintát a trastuzumab festődés alapján áramlási citometriás szeparálással két populációra választottuk, és mindkét frakcióból húszezer sejtet izoláltunk. A két populációban megvizsgáltuk a MUC4 expresszióját Western blottal, és a magas trastuzumab kötődéssel jellemezhető szubpopuláció jelentősen alacsonyabb MUC4 expressziót mutatott.

Összefoglalásul elmondható, hogy a kísérletek meggyőzően bizonyították, hogy a MUC4 JIMT-1 sejtekben maszkírozza az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját. Eredményeink hozzájárultak a trastuzumab rezisztencia egy valószínűleg klinikai szempontból is releváns mechanizmusának feltárásához.

4.16. A CD44 ligand hialuronsav szintén maszkírozza az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját

A JIMT-1 sejtek további karakterizálása és a JIMT-1 xenograftok vizsgálata során került előtérbe, hogy a sejtvonall mind *in vitro*, mind *in vivo* nagyon magas CD44 expressziót mutat, amely a hialuronsav legfontosabb celluláris receptora. Ezenkívül a munkacsoport azt a jelentős megfigyelést tette, hogy a trastuzumab rezisztencia csak ~5 hét alatt alakul ki *in vivo*. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az epitóp maszkírozásban a CD44 is részt vesz az *in vivo* lassan kiépülő, hialuronsavat is tartalmazó kötőszövetes mátrix által. Ezért részletes vizsgálatnak vetettük alá a hialuronsav szintézis hatását a trastuzumab kötődésére.

A hialuronsav hatásának felméréséhez a szintézisét gátló 4-metilumbelliferont (4-MU) használtuk. Először igazoltuk, hogy a 4-MU kezelés hatásosan csökkenti a hialuronsav szintézist *in vivo*. Majd a JIMT-1 xenograftokkal

oltott immundeficiens egereket trastuzumabbal vagy trastuzumab és 4-MU kombinációjával kezeltük 8 héten keresztül. Az állatok feláldozását követően a metszeteken az ErbB2 expressziós szintjét ErbB2-76.5 antitesttel történő festéssel, az *in vivo* kötődött trastuzumab mennyiségét anti-humán IgG-vel történő jelöléssel jellemeztük. A mikroszkópos képek megtekintése és kvantitatív analízise egyaránt arra utalt, hogy a 4-MU-val kezelt mintában jelentősen nőtt a trastuzumab relatív kötődése.

Kísérleteink bizonyították, hogy a hialuronsav *in vivo* maszkírozza az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját. Ezáltal a maszkírozásnak, mint a trastuzumab rezisztencia egyik lehetséges mechanizmusának, egy újabb manifesztációját írtuk le.

4.17. A hialuronsav szintézis gátlása növeli a trastuzumab hatását *in vivo*

Az ErbB2 hialuronsav általi maszkírozásának demonstrálása mellett fontosnak éreztük a hialuronsav szintézis gátlásának a tumorok növekedésére kifejtett hatásának vizsgálatát. Ezért JIMT-1 sejtekből xenograftokat hoztunk létre immundeficiens egerekben, és vizsgáltuk a trastuzumab, a 4-MU és kombinációjuk hatását a tumorok növekedésére. A hialuronsav szintézis gátlása önmagában nem volt hatással a daganatok növekedésére, míg a trastuzumab a várákosoknak megfelelően csökkentette a JIMT-1 xenograftok növekedését. A 4-MU a trastuzumab hatását jelentős mértékben fokozta, és a kombinációs terápiával kezelt egerekben ~6 hétig alig volt észlelhető növekmény a daganatok méretében.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy állatkísérletekkel bizonyítottuk, hogy a hialuronsav által mediált ErbB2 maszkírozás *in vivo* is jelentős, és a hialuronsav mátrix kiépülésének gátlásával a trastuzumab hatékonysága jelentősen fokozható.

4.18. Az ErbB receptorok ligandjai által indukált CD44 shedding

Az ErbB fehérjék számtalan szignalizációs útvonal csomópontjában helyezkednek el. Ezek egyike a CD44, amely a JIMT-1 sejtvonalon jelentős mértékű expressziót mutat. Ezért tűnt érdekesnek meghatározni, hogy milyen kommunikáció van a CD44 és az ErbB receptorok között ezen a sejten, és ennek mi a biológiai következménye.

A sejteket tíz monoszacharid egységből álló hialuronsav fragmentummal (HA10), EGF-fel vagy heregulinnal kezeltük 60 percen keresztül, majd ELISA segítségével meghatároztuk a CD44 intramembrán proteolízise révén a felülúszóba került CD44 ektodomén koncentrációját. Mindkét növekedési faktor a HA10-hez hasonló mértékű CD44 sheddinget váltott ki. A CD44 proteolízise mellett internalizációját is követtük konfokális mikroszkópia segítségével. HA10-zel, EGF-fel és heregulinnal kezelt JIMT-1 sejteket a CD44 intracelluláris (anti-CD44cyto) és extracelluláris (Hermes-3) doménje elleni antitesttel kettősen festettünk. A mikroszkópos képek alapján mindhárom anyag jelentős mértékű CD44 internalizációt váltott ki, amit a CD44-pozitív intracelluláris vezikulumok megjelenése bizonyított. Mivel a hialuronsav által kiváltott CD44 shedding és intramembrán proteolízis a sejtek motilitását fokozza, meg kívántuk vizsgálni, hogy az ErbB receptorokat stimuláló növekedési faktorok is kiváltanak-e ilyen hatást. *In vitro* karcolásos vizsgálat („scratch assay”) segítségével bizonyítottuk, hogy mindkét növekedési faktor a HA10-hez hasonló mértékű migráció fokozódást váltott ki.

A CD44-ErbB kommunikációról eddig bemutatott eredmények meggyőzően bizonyítják, hogy az ErbB receptorcsalád és a hialuronsav legfontosabb celluláris receptora között együttműködés valósul meg. Mivel a CD44 intracelluláris fragmentjének keletkezése a motilitás fokozódásához vezet, ez egy külön utat

biztosít az ErbB fehérjét aktiváló növekedési faktoroknak a metasztázis fokozására.

4.19. ErbB1 és ErbB2 ellenes antitestek hatása a CD44 proteolízisére és az általa indukált migrációra

Az előző fejezetben leírt ErbB-CD44 együttműködés felveti azt a lehetőséget, hogy a CD44 intramembrán proteolízisét és a motilitás következményes fokozódását befolyásolni lehet ErbB protein ellenes monoklonális antitestekkel. A kísérletekben három ErbB ellenes antitest hatását vizsgáltuk: a trastuzumabét, a pertuzumabét és a cetuximabét. Először az EGF és heregulin által kiváltott effektusokra kifejtett hatásukat vizsgáltuk meg. ELISA kísérletek azt mutatták, hogy a pertuzumab szignifikánsan gátolta a heregulin és az EGF által kiváltott CD44 sheddinget, intramembrán proteolízist és internalizációt ($p < 0,05$). A cetuximab esetében csak az EGF által kiváltott válaszokra kifejtett hatásokat vizsgáltuk, és eredményeink szerint az antitest teljesen blokkolta az EGF hatását mindhárom paraméterre ($p < 0,05$). A trastuzumab nemcsak a heregulin által kiváltott hatásokat, de a hialuronsav oligoszacharid által okozott CD44 sheddinget, internalizációt és intramembrán proteolízist is gátolta ($p < 0,05$).

Mivel a trastuzumabot széleskörűen alkalmazzák ErbB2-t fokozottan expresszáló emlőtumzorok kezelésére, ezért érdekesnek tűnt annak megvizsgálása, hogy az antitest milyen hatást fejt ki a CD44 sheddingre *in vivo*. Kisméretű tumorok (térfogat $\sim 400 \text{ mm}^3$) összehasonlítása esetén a szérumban CD44 koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a trastuzumabbal kezelt állatokban ($p < 0,05$), tehát a trastuzumab hatásosan gátolja a CD44 sheddinget *in vivo* is. Nagyméretű tumorok (térfogat $\sim 850 \text{ mm}^3$) esetében nem volt szignifikáns eltérés a kontroll és a kezelt csoportok értékei között ($p > 0,05$). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a trastuzumab nem képes a nagyobb méretű daganatokba

kellő mértékben penetrálni vagy a daganatok nagy mérete, vagy az addigra kiépülő kötőszövetes, hialuronsavas mátrix miatt.

A terápiás hatás megítélése szempontjából fontos volt az ErbB ellenes antitestek motilitásra kifejtett hatásának analízise. *In vitro* karcosító vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a hialuronsav oligoszacharid és a heregulin által kiváltott motogén hatást a trastuzumab szignifikánsan gátolta ($p < 0,05$). Az EGF által kiváltott motilitás fokozódás szenzitív volt cetuximabra, és a pertuzumab mind az EGF, mind a heregulin által indukált motogén választ blokkolta ($p < 0,05$). Az antitestek motilitás vizsgálatokkal feltárt inhibíciós profilja megegyezett a CD44 sheddingre, internalizációra és proteolízisre kifejtett hatásspektrumukkal.

Az ebben a fejezetben ismertetett eredmények meggyőzően alátámasztják, hogy az ErbB fehérjék fontos reguláló szerepet töltenek be a CD44 által mediált folyamatokban. Ez egyrészt fokozza az ErbB receptorokat és a CD44-et együttesen kifejező daganatsejtek malignitását, ugyanakkor terápiás beavatkozási lehetőséget is kínál.

4.20. Az ErbB1 expresszió RNS interferenciával történő gátlása apoptózist vált ki és csökkenti az EGF indukálta hatásokat

Az ErbB1-et fokozottan expresszáló és tőle függő daganatok terápiájában a tirozin kináz inhibitorok és monoklonális antitestek mellett szóba jön a fehérje expresszió gátlása. A 2000-es évek elején ígéretes új eljárásként került a köztudatba az RNS interferencia, amelyről bebizonyosodott, hogy eukarióta sejtekben is specifikusan és nagy hatékonysággal képes gének expresszióját gátolni. A jelen fejezetben ismertetendő vizsgálatokkal úttörő módon bizonyítottuk, hogy az ErbB1 expresszió RNS interferenciával történő gátlásának az ErbB1-et fokozottan kifejező daganatokra biológiai hatása van.

Három különböző siRNS-t terveztünk ErbB1 ellen (ErbB1-1, ErbB1-2 és ErbB1-3 siRNS), és egyet GFP ellen (GFP-2 siRNS), amit általában negatív

kontrollként használtunk. A431 sejtekben mindhárom ErbB1 ellenes siRNS hatásosnak bizonyult az ErbB1 expresszió gátlására, amit Western blottal és áramlási citométerrel is igazoltunk. Az EGF indukálta válaszok RNS interferencia általi gátlásának demonstrálására kontroll és ErbB1 ellenes siRNS-sel transzfectált A431 sejteket stimuláltunk 0.1 ng/ml EGF-fel 5 percig 37°C-on, majd a sejteket fixálást és permeabilizálást követően ErbB1 és foszfortirozin ellenes antitestekkel festettük. Mikroszkópos és áramlási citometriás eredményeink szerint az EGF indukálta tirozin foszforilációt csak az ErbB1 expressziót erősen gátló ErbB1-1 és ErbB1-3 siRNS-ek gátolták szignifikánsan. Az ErbB1 expresszió RNS interferenciával történő gátlása csökkentette az A431 sejtek szérum és 0,1 ng/ml EGF által kiváltott proliferációját. A hatás mindhárom ErbB1 ellenes siRNS esetében szignifikáns volt. Az ErbB1 ellenes siRNS a transzfectálódott sejtekben apoptózist váltott ki, amit a szub-G1 csúcs megjelenése bizonyított a DNS hisztogramon. A431 sejteken az EGF 1 ng/ml-es koncentrációban a proliferációt gátolja. Az ErbB1 ellenes siRNS-sel történő transzfectió ezt a hatást is blokkolta.

A fenti kísérletekkel bizonyítottuk, hogy RNS interferenciával az ErbB1 expresszió és az EGF indukálta válaszok hatékonyan gátolhatók. Az ErbB1-től függő, azt fokozott mértékben expresszáló sejtekben az ErbB1 kifejeződés RNS interferenciával történő gátlása apoptózist okoz. Ez, az *in vivo* transzfectió technikai problémáinak megoldása után, elvileg lehetőséget ad ilyen jellegű tumorok kezelésére.

5. Következtetések, hasznosíthatóság

Az ErbB receptorok klaszterizációjával kapcsolatos eredményeink új megvilágításba helyezik az EGF receptorcsalád tagjainak aktivációs mechanizmusait, és több olyan módszertani fejlesztést is magukba foglalnak, amelyek az e téren folytatott kutatások során hasznosíthatóak.

- Kifejlesztettünk több áramlási citometriás és konfokális mikroszkópiás módszert, melyek membránfehérjék homo- és heteroklaszterizációjának kvantitatív jellemzését teszik lehetővé.
- Leírtuk a receptor asszociáció dimernél magasabb hierarchikus szintjeit. Ennek több módszerrel történt megerősítése bizonyítja a háromszintű receptor klaszterizáció modell létjogosultságát.
- Bebizonyítottuk, hogy az ErbB2 a lipid tutajokban helyezkedik el, és a tutajok lipid környezete gátolja az ErbB2 homoasszociációját.
- Az ErbB1 ligand indukálta internalizációját az ErbB2 gátolja, míg az ErbB3-nak nincs erre jelentős hatása.
- A fehérje asszociációk magasabb szintjeinek biológiai szerepe arra utal, hogy a receptorok aktivációja ezek strukturális megbolygatásával is elérhető és a jövőben akár daganatok terápiájában is kihasználható.

A dolgozatban leírt másik jelentős kísérletsorozatban az ErbB receptorok és lipid tutajok terápiás célpontként való felhasználhatóságával kapcsolatban tettünk fontos megállapításokat.

- Leírtuk, hogy a MUC4 transzmembrán mucin és a pericellulárisan elhelyezkedő hialuronsav fokozott expressziója gátolja a trastuzumab kötődését ErbB2-t fokozottan kifejező emlőtumor sejtekhez az antitestkötő epitóp maszkírozása által.
- A maszkírozás a trastuzumab rezisztencia kialakulásának egy általunk leírt új mechanizmusa. Ezen eredményeinknek nyilvánvalóan fontos

dc_380_12

klinikai következményei vannak, hiszen rámutatnak arra, hogy az ErbB2 maszkírozása trastuzumab rezisztenciához vezet, és az ezért felelős molekulák termelésének gátlása szinergikusan növelheti a trastuzumab terápiás hatékonyságát.

- A hialuronsav receptor CD44 funkcionális molekuláris komplexet képez az ErbB receptorokkal, és mind ligandumjaik, mint a hozzájuk kötődő antitestek az egész komplex működését befolyásolják.
- Megállapítottuk, hogy az ErbB1 expresszió RNS interferencia segítségével történő gátlása apoptózishoz vezet a receptort fokozottan kifejező sejtekben.
- Bebizonyítottuk, hogy az elisidepsin hatását a sejtek ErbB expressziója nem befolyásolja, és hogy a gyógyszer a lipid tutajokon keresztül, folyékony rendezett domének indukálása révén fejt ki citotoxikus hatását.

6. A disszertációban tárgyalt cikkek listája

1. **Nagy, P.**, G. Vereb, Z. Sebestyén, G. Horváth, S. J. Lockett, S. Damjanovich, J. W. Park, T. M. Jovin, and J. Szöllősi. 2002. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci* 115:4251-4262.
2. **Nagy, P.**, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin. 2003. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp Cell Res* 285:39-49.
3. Lidke, D. S., **P. Nagy**, R. Heintzmann, D. J. Arndt-Jovin, J. N. Post, H. E. Grecco, E. A. Jares-Erijman, and T. M. Jovin. 2004. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat Biotechnol* 22:198-203.
4. **Nagy, P.**, E. Friedländer, M. Tanner, A. I. Kapanen, K. L. Carraway, J. Isola, and T. M. Jovin. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65:473-482.
5. **Nagy, P.**, L. Bene, W. C. Hyun, G. Vereb, M. Braun, C. Antz, J. Paysan, S. Damjanovich, J. W. Park, and J. Szöllősi. 2005. Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins. *Cytometry A* 67:86-96.
6. Pályi-Krek, Z., M. Barok, J. Isola, M. Tammi, J. Szöllősi, and **P. Nagy**. 2007. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* 43:2423-2433.
7. Pályi-Krek, Z., M. Barok, T. Kovács, H. Saya, O. Nagano, J. Szöllősi, and **P. Nagy**. 2008. EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44. *Cancer Lett* 263:231-242.

8. Szabó, Á., G. Horváth, J. Szöllősi, and **P. Nagy**. 2008. Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophys J* 95:2086-2096.
9. Szabó, A., J. Szöllősi, and **P. Nagy**. 2010. Coclustering of ErbB1 and ErbB2 revealed by FRET-sensitized acceptor bleaching. *Biophys J* 99:105-114.
10. **Nagy, P.**, J. Claus, T. M. Jovin, and D. J. Arndt-Jovin. 2010. 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* 107:16524-16529.
11. Mocanu, M. M., T. Varadi, J. Szollosi, and **P. Nagy**. 2011. Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA). *Proteomics* 11:2063-2070.
12. Váradi, T., J. Roszik, D. Lisboa, G. Vereb, J. M. Molina-Guijarro, C. M. Galmarini, J. Szöllősi, and **P. Nagy**. 2011. ErbB protein modifications are secondary to severe cell membrane alterations induced by elisidepsin treatment. *Eur J Pharmacol* 667:91-99.

7. Köszönetnyilvánítás

Egy nagydoktori disszertáció hosszú évtizedek munkájának gyümölcse, hiszen nemcsak azt a mintegy egy évtizedet kell tekintetbe venni, amely alatt a benne tárgyalt cikkek publikációra kerültek, hanem az azt megelőző hosszú évek tanulmányait és kutató munkáját is. Ezért, talán kicsit formabontóan, először családomnak szeretnék köszönetet mondani, hogy a munkájába elmerülő kutatót támogatták. Szüleim példamutató kitartása, szerénysége és odaadása, mellyel a család, a gyermek és a munka felé fordultak, túl nem értékelhető háttérrel és lendülettel adott nekem, és példaként áll még ma is előttem. Édesapám sajnos nem élhette meg ezt a napot, ezért Neki szeretném külön kifejezni hálámat, amiért csendesen a háttérből mindig utat mutatott nekem. Édesanyám kifogyhatatlan szeretete és féltése olyan útravalóval látott el, amit friss apaként értek meg csak igazán. Feleségem és kislányom édesanyja, Ági, nemcsak a meleg családi fészek megteremtésével, de közlemények társszerzőjeként is segítő kezet nyújtott. Kislányunk, Anna, még talán nem sokat ért az előző oldalakon leírtakból (bár ebben nem vagyok mindig biztos), tengerkéék szemének igéző tekintete és ragaszkodó szeretete mindig meggyőz arról, hogy a kihívásokkal szembe kell nézni.

A karcagi Gábor Áron Gimnázium tanárai rávezettek a felfedezés szeretetére és az igényes munka tiszteletére. A Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében számtalan mentorom volt a hosszú évek során. Közülük Matkó Jánosnak és Mátyus Lászlónak a TDK-s évek alatt nyújtott témavezetésért és pályafutásomat meghatározó útmutatásaikért tartozom köszönettel. A PhD-s évek óta dolgozom szorosabban Szöllősi Jánossal, aki segített az önálló kutató munka rejtelmeinek elsajátításában, és akivel azóta is megszámlálhatatlanul sok közös munkánk volt. Damjanovich Sándort azért illeti köszönet, mert az Intézet igazgatójaként, ill. az MTA kutatócsoport vezetőjeként támogatta önálló

elképzeléseim megvalósítását és megteremtette azt a háttérrel, amely meghatározó volt számtalan, a dolgozatban említett ötlet kidolgozásához.

Természetesen köszönöm a cikkekben társszerzőként megjelenő, továbbá név szerint meg nem említett munkatársaimnak is a támogatást és a kooperációt.

8. Támogató pályázatok

A nagydoktori értekezés elkészítését, ill. a benne tárgyalt kísérletek, projektek kivitelezését a következő szervezetek támogatták: OTKA (F49025, K72677, K103906, NK101337), Nemzeti Innovációs Hivatal (Baross Gábor Program: REG_EA_09-1-2009-0010), Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025).