

**Részletes szakmai beszámoló „Az erbB proteinek asszociációjának kvantitatív jellemzése”
című OTKA pályázatról (F049025)**

A pályázat megvalósítása során célunk volt egyrészt a molekulák asszociációjának tanulmányozására FRET módszerek fejlesztése (1-3), másrészt a molekuláris asszociációk biológiai hatásának tanulmányozása (4-8).

1. Kalibrációs módszer kidolgozása a GFP analógok közötti FRET mérésekhez

A GFP variánsokkal történő fluoreszcens jelzést széleskörűen alkalmazzák fehérjék intracelluláris eloszlásának és kölcsönhatásainak vizsgálatára. Bizonyos GFP variáns párok (pl. CFP-YFP vagy BFP-GFP) alkalmasak fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) mérésekhez donor-akceptor párnak, de korábban a kalibráció megoldatlansága miatt nem lehetett a méréseket kvantitatívan elvégezni. Kidolgoztunk egy módszert, amelyben a donor (pl. CFP) és akceptor (pl. YFP) GFP analóg közé három különféle összekötő részt klónoztunk. A kalibrációs sorozat segítségével meg tudtuk határozni a FRET mérésekhez szükséges α paramétert, amely egy gerjesztett állapotú akceptor és donor molekula fluoreszcencia intenzitásának hányadosát adja meg. A módszerrel sikeresen szeparáltunk kölcsönható, tehát FRET-et mutató fehérjéket tartalmazó élesztősejteket olyan sejtektől, melyben FRET nem volt mérhető (Cytometry, 67A: 86-96., 2005).

2. Kétoldali FRET mérések két molekulapár kölcsönhatásának korrelációjának vizsgálatára

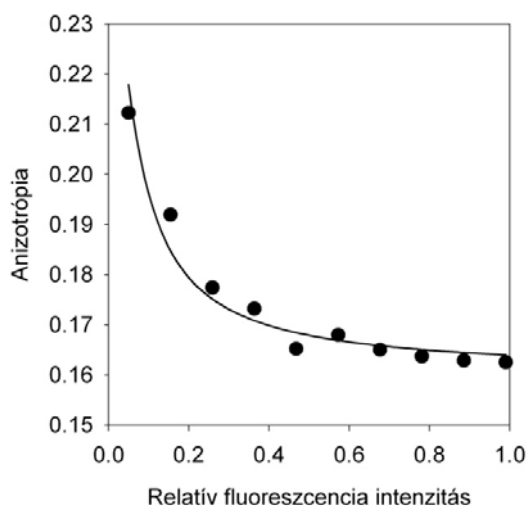
Hagyományosan FRET mérésekkel egy molekulapár (dimer) jelenlétét lehet kimutatni. A projekt céljai között szerepelt a FRET módszer alkalmazása molekula trimerek kimutatására. Ennek első lépéseként kidolgoztunk egy módszert, amellyel két molekulapár (pl. A-B és B-C) között külön-külön mérhető FRET hatásfokokat egyszerre lehet meghatározni. A módszer alkalmazhatóságát konfokális mikroszkópos mérésekkel igazoltuk, ahol a két FRET érték ($FRET_{A-B}$ és $FRET_{B-C}$) közötti térbeli korrelációt is vizsgáltuk (Cytometry A 73A: 209-219, 2008). A munka jelenleg is folyó fázisában a kétlépcsős FRET jelenség kimutatásával a trimerek tényleges kimutatását tűztük ki célul. A kétlépcsős FRET során az A molekula gerjesztése után a B, majd a C molekula kerül FRET segítségével gerjesztett állapotba, és ezen kölcsönhatás detektálása az ABC molekulatrimert jelenlétét bizonyítja.

3. Áramlási citometriás anizotrópia mérések molekula homoklaszterek tanulmányozására

A hagyományos FRET méréseket két, spektroszkópiailag különböző molekula között hajtják végre (hetero-FRET). Van a FRET-nek egy olyan változata, amikor két azonos típusú molekula között történik energiaátadás. Ez a jelenség a homo-FRET, aminek egyetlen manifesztációja a fluoreszcencia anizotrópia csökkenése. A homo-FRET-et csak molekulák homoasszociációjának mérésére lehet használni, de ott alkalmas a molekulaklaszter méretének kvantitatív meghatározására. Levezettünk egy képletet, amely a fluoreszcencia anizotrópia (r) és a molekulaklaszter mérete (N), valamint a klaszterben nem levő, monomer molekulák aránya (mon) közötti összefüggést írja le:

$$r_{s,k,N} = \frac{(1-mon) \sum_{k=0}^N \left[\binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} \left(r_1 \frac{(1+d^6)}{1+k d^6} + r_{FRET} \frac{(k-1)d^6}{1+k d^6} \right) \right] + s \cdot mon \cdot r_1}{(1-mon) \sum_{k=0}^N \binom{N}{k} s^k (1-s)^{N-k} \frac{k}{N} + s \cdot mon} \quad (1)$$

A módszer alkalmazása során a vizsgált fehérjét fluoreszcensen jelölt és jelöletlen antitest keverékével jelöltük meg. A fluoreszcens antitest arányát (telítettség, a képletben s -sel jelölve) folyamatosan változtatva megmértük az anizotrópia változását, és a fenti egyenletet az anizotrópia-telítettség pontsorozatra illesztettük az N és mon paraméterek változtatásával (1. ábra). A módszert sikeresen alkalmaztuk áramlási citometriás mérések során az ErbB1 és ErbB2 fehérjék klaszterméretének meghatározására (l. 4. pont, Biophys. J., 95:2086-2096, 2008).

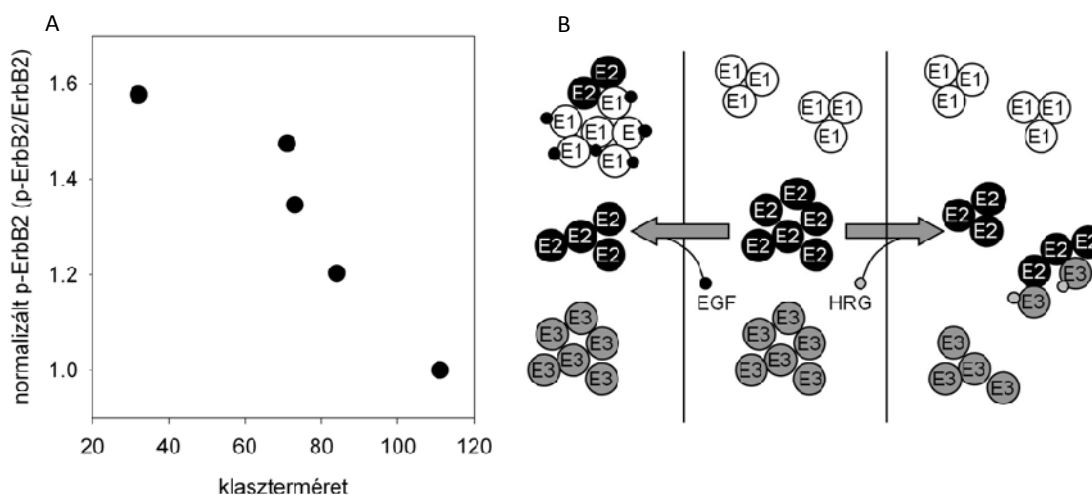


1. ábra

Reprezentatív anizotrópia mérési pontok és illesztett görbe heregulin stimulált SKBR-3 sejtek ErbB2 homoklasztereinek vizsgálata során. Az görbe akkor mutatott legjobb illeszkedést a mérési pontokra, ha ~60%-os monomer arányt és ~30 molekulát tartalmazó klasztereket tételeztünk fel.

4. Az ErbB1 és ErbB2 molekulák homoklasztereinek eltérő viselkedése

A 3-as pontban ismertetett módszer segítségével megmértük stimulálatlan és EGF stimulált sejtek felszínén az EGF receptor (ErbB1) klaszterképződését. Tapasztalataink szerint az ErbB1 molekula nyugvó sejtek felszínén nagyrészt monomer állapotban van, EGF stimuláció hatására azonban az ErbB1 nemcsak a már jól ismert dimereket alkotja, hanem olyan homoklasztereket is, amelyben kb. 10 ErbB1 protein található. Az ErbB2 viselkedése a fentiekkel ellentétes volt: nyugvó sejtek felszínén az ErbB2 igen nagyfokú homoasszociációs hajlamot mutatott, hiszen egy homoklaszterben ~100 ErbB2 molekulát találtunk. EGF és heregulin stimuláció hatására az ErbB2 homoklaszterek mérete igen jelentősen csökkent. Úgy gondoljuk, hogy az ErbB2 homoklaszterekben aktiválatlan ErbB2 található, amely növekedési faktor stimuláció hatására elhagyja a homoklasztereket, hogy az EGF és heregulin receptoraival (ErbB1 és ErbB3) heterodimerizáljon (2. ábra). Így az ErbB2 homoklaszterek az aktiválatlan ErbB2 raktározó helyének tekinthetők. Az utóbbi feltételezést támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy az ErbB2 klaszterméret fordított arányosságot mutatott az ErbB2 tirozinfoszforiláció mértékével (2. ábra; Biophys. J., 95:2086-2096, 2008).



2. ábra

A: Az ErbB2 klaszterméret fordítottan arányos az ErbB2 aktiváltsági szintjét jellemző tirozin foszforiláció mértékével.

B: Modellünk szerint a növekedési faktor (EGF vagy heregulin) stimuláció hatására az ErbB2 heterodimereket alkot az elsődleges EGF és heregulin receptorokkal (ErbB1 és ErbB3), és ezért eltávolítódik az ErbB2 homoklaszterekből.

5. Fluoreszcensen jelzett EGF kötődésének vizsgálata

Fluoreszcensen jelölt EGF segítségével megjelöltük az EGF receptort (ErbB1) három különböző sejtvonalon. Az egyik az ErbB molekulacsaládból szinte kizárólag az ErbB1-et fejezte ki, míg a másik kettő az ErbB1-et az ErbB2-vel vagy az ErbB3-mal koexpresszálta. Az ErbB1 EGF által kiváltott konformációváltozását és homo-, ill. heterodimerizációját is magába foglaló matematikai modellt alkottunk, amely alkalmasnak bizonyult a fluoreszcensen jelzett ErbB1 molekula EGF kötődésének kvantitatív jellemzésére. A mérések során áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az EGF kötődését a növekedési faktor koncentrációjának függvényében, és a modellt a telítési görbékre illesztettük. Az illesztések kiértékelése még jelenleg is tart. Előzetes eredményeink szerint az ErbB1 molekula hajlamosabb heterodimerizációra, mint homodimerizációra, és az ErbB2-t szívesebben választja partnerül, mint az ErbB3-at.

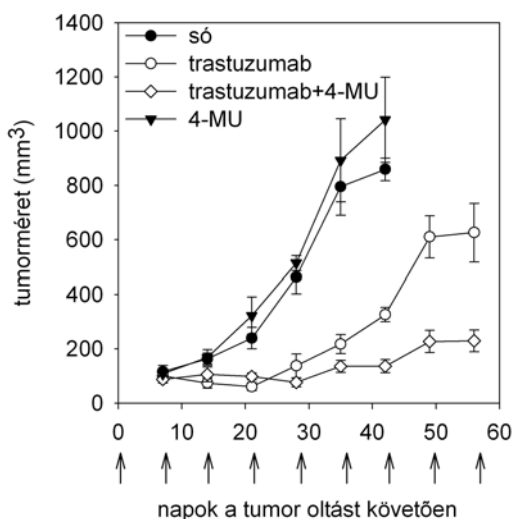
6. A trastuzumab elsősorban ADCC reakción keresztül fejt ki hatását

A trastuzumab hatásmechanizmusát illetően hosszú évek óta vita folyik az irodalomban. Az egyik elképzelés szerint a trastuzumab az ErbB2-re gyakorolt közvetlen hatásával gátolja az onkoprotein működését, mások szerint viszont a tumorsejtek felszínéhez kötődő trastuzumab antitestfüggő celluláris citotoxicitási reakciót (ADCC) vált ki. Egérbe oldott humán emlőtumor sejtvonalból (JIMT-1) xenograftokat hoztunk létre, és trastuzumab antitesttel vagy trastuzumab F(ab)₂-vel kezeltük őket. Tapasztalataink szerint az F(ab)₂ teljesen hatástalan volt, ami arra utal, hogy az Fc rész által kiváltott reakció (valószínűleg ADCC) áll hatásának hátterében (Mol. Cancer Ther. 6: 2065-2072, 2007).

7. A CD44-ErbB2 kölcsönhatás, ill. annak biológiai hatásának vizsgálata

Az ErbB2 nemcsak az ErbB családon belüli molekulákkal hat kölcsön. Ilyen családon kívüli asszociációs partner a CD44, a sejtek elsődleges hialuronsav receptora. Koprecipitációs és FRET méréseink szerint az ErbB2 és a CD44 többféle emlőtumor sejtvonalban dimerizálódik. A kölcsönhatásnak számos biológiai következménye van. Egyrészt a CD44 serkenti az ErbB2 antitest (pl. trastuzumab) által kiváltott internalizációját, hiszen a CD44 expresszió RNS interferenciával történő gátlása az ErbB2 internalizációját csökkentette. A fenti összefüggést megfigyeltük trastuzumabbal kezelt egerek emlőtumor xenograftjainak vizsgálata során is. E témában talán legfontosabb megfigyelésünk az, hogy a trastuzumab

iránti rezisztencia kifejlődésében a trastuzumab kötő epitóp maszkírozása is szerepet játszik. Mivel emlőtumor xenograftokban a hialuronsav pericelluláris mennyisége fordított arányban állt a sejtekhez kötődő trastuzumab mennyiségével, a maszkírozás egyik legfontosabb kiváltója maga a hialuronsav, melyet a tumor és stróma sejtek termelnek. Ha az egereket a hialuronsav szintézisét gátló 4-metilumbelliferonnal (4-MU) kezeltük, akkor a trastuzumab rezisztencia kifejlődése sokkal lassabban ment végbe (3. ábra; Eur. J. Cancer, 43: 2423-2433, 2007).



3. ábra

Emlőtumor xenograftok növekedését a fiziológias sóval történő kezeléshez képest a trastuzumab jelentősen gátolta, azonban a tumorok a 30. nap körül növekedésnek indultak a trastuzumab rezisztencia kialakulása miatt. Ha a trastuzumab kezelést 4-MU-val kombináltuk, a rezisztencia kialakulását gátolni tudtuk. Az egerek trastuzumabbal és sóval történő oltását a nyilaknak megfelelő időpontokban, hetente végeztük. A 4-MU kezelés *per os* történt naponta.

8. Az ErbB1 és az ErbB2 a CD44-gyel funkcionálisan aktív komplexet alkot

Az EGF és a heregulin növekedési faktorokról kimutattuk, hogy a CD44 intracelluláris proteolízisét és sheddingjét váltják ki. Méréseink szerint a CD44 shedding jelentősen fokozta a sejtek motilitását. Az EGF és heregulin által kiváltott CD44 shedding és motilitás növekedés blokkolható volt pertuzumab kezeléssel. A pertuzumab egy ErbB2 ellenes antitest, amely az ErbB2 heterodimerizációját gátolja. Így az eredmények arra utalnak, hogy a folyamatban valószínűleg részt vevő metalloproteázst az ErbB2 aktiválja. CD44 sheddinget és motilitás fokozódást hialuronsav kezeléssel is el tudtunk érni, amit viszont trastuzumab kezeléssel lehetett gátolni. Ez a trastuzumab egy nem várt hatásmechanizmusára utal, hiszen eredményeink szerint a tumorsejtekre gyakorolt közvetlen, az ADCC reakciótól független hatásával gátolja a tumorsejtek motilitását, ami a metasztázisképződés egyik fontos lépése. Elméletünket alátámasztja azon megfigyelésünk, hogy a trastuzumabbal kezelt, emlőtumor xenografttal rendelkező egerekben csökkent a keringő daganatsejtek száma (Cancer Lett. 260: 198-208, 2008; Cancer Lett. 263:231-242, 2008).