

OTKA T 037831 – Zárójelentés

Az emlőtumorok pathomechanizmusában fontos szerepet játszanak a tirozinkináz aktivitással rendelkező ErbB transzmembrán receptorok. Kísérleteink középpontjában az emlőtumorok közel harmadában amplifikációt mutató ErbB2 gén terméke állt. Tanulmányoztuk sejtfelszíni expresszióját, eloszlását, konformációját, más fehérjékkel és lipid környezetével való kölcsönhatását. Korábban már kimutattuk, hogy ez a receptor tirozinkináz a sejtfelszínen nem homogénean oszlik el, többszintű aggregációt mutat. Egyrészt, 2-10 nm-es skálán molekuláris homoasszociációt tudunk kimutatni fluoreszcencia rezonancia energia transzfer módszer segítségével. Másrészt, 50-800 nm-es skálán 100-2000 ErbB2 molekulát tartalmazó asszociátumokat, klasztereket, figyeltünk meg közeli mező pásztázó mikroszkópia segítségével.

Ezt követő méréseink megerősítették, hogy az IL-2R α alegységhez és a PDGF β receptorhoz hasonlóan ezek a klaszterek is nagyfokú kolokalizációt mutatnak GM-1 gazdag lipid tutajokkal. Kontrollként megvizsgáltuk az ErbB2 kolokalizációját a transzferrin receptorral is, mely lipid raftokkal nem kolokalizálódott limfoid sejteken, s ez alacsonynak mutatkozott (C=0,1; a C számítására saját programot írtunk).

A konfokális mikroszkópiás mérések eredményei arra mutattak, hogy a lipid tutajok, bár az ErbB2 molekulák jelentős hányadának gyűjtőhelyeül szolgálnak, az ErbB2 homoasszociációt nem segítik elő, sőt, a homoasszociáció mértékét jelző fluoreszcencia rezonancia energia transzfer értéke negatívan korrelál a GM-1 gangliozidot jelölő CTX B fluoreszcencia intenzitásával. Ezek alapján mondhatjuk, hogy a lipid tutajokban kolokalizálódó klaszterekben az ErbB2 nem mutat nagymértékű homoasszociációt. Mivel az ErbB2 aktivációt mind homoasszociáció, mind más ErbB molekulákkal való heteroasszociáció eredményezheti, feltételezhetjük, hogy a lipid tutajokban elsősorban heteroasszociált ErbB2 (pl. ErbB2-ErbB3 dimer) jelenti az aktív jelátviteli komplexumot. Ennek bizonyítására további kísérleteket végeztünk. Kihasználtuk azt, hogy a CTX B kezelés, ha azt 37 °C-n, tehát a membrán fázisátalakulási hőmérsékete felett végezzük, megváltoztatja az ErbB2 lipid környezetét, ugyanis az ErbB2 – lipid tutaj kolokalizációt csökkenti. A mechanizmust illetően feltételezhető a GM1 gangliozidok pentamer toxin általi keresztükötése, és hosszabb időn át (>5') alkalmazva internalizáció is. Megvizsgáltuk azt is, hogy a kaveolint tartalmazó lipid tutajok átfednek-e a GM1-t tartalmazó tutajokkal, illetve bennük is megtalálható-e az ErbB2 fehérje. Megállapítottuk, hogy az antitesttel jelölt kaveolák nem kolokalizálódnak az ErbB2 fehérjékkel illetve a GM1-et tartalmazó lipid tutajokkal. Ha keresztbe kötöttük CTX-B-vel a GM1-et tartalmazó lipid tutajokat, azok kaveolinnal való kolokalizációja megnőtt, az ErbB2 klaszterektől elváltak. Az ErbB2 ErbB családon belüli asszociációi közül vizsgáltuk az ErbB2-ErbB2 homoasszociációt, az ErbB1-ErbB2 és ErbB3-ErbB2 heteroasszociációt mikroszkópos energiatranszfer kísérletekben. Azt tapasztaltuk, hogy CTX B kezelés (37 °C) hatására csak az ErbB3-ErbB2 heteroasszociáció csökken jelentős mértékben, a másik két molekuladimer nem módosul. Ennek megfelelően a lipid tutajok keresztbe kötése CTX B-vel csökkentette az ErbB2-ErbB3 dimeren keresztül heregulinnal indukált jelátviteli folyamat hatékonyságát, amit a folyamatban résztvevő Shc fehérje foszforilációjának csökkenése jelzett.

Az ErbB2-t túlexpresszázó tumorok kezelésében fontos szerep jut a 4D5 jelű, anti-ErbB2 monoklonális antitest humanizált változatának (Herceptin, generikus nevén trastuzumab). Ez az antitest ErbB2 internalizációt indukál, ami feltételezhetően hatásmechanizmusának részét képezi. Méréseink szerint az ErbB2 4D5 által indukált internalizációja csak akkor jön létre, ha az ErbB2 a lipid tutajokban helyezkedik el, mert a CTX B (37 °C) kezelés csökkentette az ErbB2 4D5 által kiváltott internalizációját, így feltehető, hogy az internalizációban résztvevő molekulák (vagy egy részük) a raftokhoz köthetők. Ennek megfelelően fontos megfigyelésünk volt, hogy az F5 jelű egyláncú variábilis régióból álló antitest fragmentumok (scFv) a hozzájuk kötött liposzómákkal együtt szintén

elsősorban a lipid tutajokban elhelyezkedő ErbB2 molekulákhoz kötődnek (a két jel keresztkorrelációja $C=0,72$), ezáltal lehetőséget biztosítva az immunliposzómák sejtspecifikus internalizációjára, citotoxikus tartalmuknak a dagantsejtbe juttatására.

Az ErbB2 és $\beta 1$ alegységet tartalmazó integrinek kölcsönhatásának vizsgálata olyan folyamatokat tár fel, melyeken keresztül jobban megérthető a metasztázisképzés jelátviteli háttere. Az integrinek és az ErbB mediált transzmembrán jelátviteli utak jelentőségének ismeretében e két molekulacsalád viszonyát vizsgáltuk, különös tekintettel a trastuzumab rezisztencia jelenségére. A mérésekhez használt trastuzumab rezisztens sejtvonalak az emlőtumor eredetű JIMT-1 és gyomorrák eredetű MKN-7, a szenzitív sejtvonalak az emlőtumor eredetű SKBR-3 és gyomordaganatból származó N-87 voltak. A trastuzumabra rezisztens sejtek alacsonyabb ErbB2 és magasabb $\beta 1$ integrin expressziót mutattak. Legalacsonyabbnak a trastuzumabra érzékeny SKBR-3 sejtek esetén a $\beta 1$ integrinek szintjét találtuk. A többi ErbB és integrin alegység tekintetében nem volt jelentős különbség a trastuzumab érzékeny és rezisztens sejtek között.

Annak ismeretében, hogy az ErbB2 és $\beta 1$ integrinek társulása jelentős lehet a malignusan átalakult sejtekben, elképzelhető, hogy az ErbB2 és integrinek közötti kölcsönhatások megváltozása egyik oka lehet a trastuzumab rezisztenciának. Minden sejtvonalon (trastuzumab rezisztenciától függetlenül) jelentős kolokalizációt találtunk az ErbB2 és $\beta 1$ integrinek között, emellett mindkét membránfehérje nagymértékben a lipid tutajokban helyezkedett el CTX-B jelölés alapján. Érdekes módon a gyomortumor eredetű MKN-7 és N-87 sejtvonalak esetén szignifikánsan nagyobb kolokalizációt tapasztaltunk a $\beta 1$ integrin és a raftok között, mint az emlőtumor eredetű SKBR-3 és JIMT-1 esetében. FRET mérésekkel az ErbB2 és $\beta 1$ integrin között szignifikáns kölcsönhatást találtunk JIMT-1 és N-87 esetén, ami azt sugallta, hogy az ErbB2 és $\beta 1$ integrin molekulák között nemcsak kolokalizáció, de molekuláris kölcsönhatás is van, míg SKBR-3 és MKN-7 sejteken a FRET hatásfok alacsonyabb volt. Trastuzumab, EGF vagy heregulin kezelés hatására egyik sejtvonal esetén sem változott meg a FRET hatásfok.

A trastuzumab terápia és a ligandumok hatásának modellezésére további kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk trastuzumabbal, EGF-fel és heregulinnal kezelt sejteken. A kezeléseket egyik sem változtatta meg az ErbB2/ $\beta 1$ integrin kolokalizációt jelentősen, viszont a trastuzumabbal kezelt emlőtumorsejtek szignifikánsan, bár nem túl nagy mértékben csökkent $\beta 1$ /lipid tutaj, valamint ErbB2/lipid tutaj kolokalizációt mutattak. Ez a változás nem volt megfigyelhető gyomorrák eredetű sejteken.

Az interakciók erősségének becslésére, és a fehérjék által leginkább preferált asszociációs partnerek meghatározására keresztköti kísérleteket végeztünk. A lipid tutajok CTX-B általi keresztköti során a glikozil-foszfátidilinozitol (GPI) horgonnyal rendelkező fehérjék együttmozgása következik be. A CTX-B kezelés minden sejtvonalon szignifikánsan csökkentette a kolokalizációt az ErbB2 molekulák és a lipidtutajok között, s hasonló keresztkorreláció csökkenés volt megfigyelhető a $\beta 1$ integrin molekulák és lipid tutajok között is. Az ErbB2 és $\beta 1$ integrinek ily módon történő kivonhatósága azt mutatja, hogy ezek a fehérjék nem kötődnek szorosan a lipid tutajokhoz, illetve nem követik szorosan a tutajok mozgását. A kísérletek során használt sejtvonalakon CTX-B kezelés hatására az ErbB2/ $\beta 1$ integrin kolokalizáció nem, vagy csak kis mértékben változott. Ebből arra következtetünk, hogy az ErbB2/ $\beta 1$ integrin asszociáció erősebb, mint e két fehérje és a lipid tutajok kölcsönhatása. $\beta 1$ integrinek másodlagos antitestek általi keresztköti „kiszabadította” a $\beta 1$ molekulákat az ErbB2 molekulákkal, illetve lipid tutajokkal képzett komplexeikből. Ugyanakkor az ErbB2/lipid tutaj asszociációk nem változtak meg az integrinek keresztköti hatására. Szérummentesen tartott SKBR-3 és JIMT-1 sejtekben az ErbB2 trastuzumab hatására foszforilálódott, de a $\beta 1$ integrinek keresztköti még a $\beta 1$ integrinokat nagy számban kifejező JIMT-1 sejtek esetén sem változtatta meg az ErbB2 foszforilációt.

Eredményeink alapján elképzelhető, hogy az ErbB2 és a $\beta 1$ integrin GM-1 pozitív domének perifériájához lazán kapcsolódnak, és annak ellenére, hogy az ErbB2 és a $\beta 1$ integrinek molekulárisan asszociáltak, ez a kapcsolat közöttük viszonylag gyenge. Emellett, bár a trastuzumab rezisztens sejtvonalak $\beta 1$ integrin expressziós szintjét magasabbnak találtuk, ez nem befolyásolta a trastuzumab hatására bekövetkező ErbB2 foszforiláció mértékét, ami szintén a két fehérje közötti gyenge kölcsönhatásra utal. Összességében tehát a trastuzumab rezisztencia jelenségét nem magyarázza a sejtfelszínen nagy mennyiségben megtalálható $\beta 1$ integrin alegység ErbB2 jelátvitelét befolyásoló hatása.

Mivel a különféle sejtek, beleértve számos daganatsejtet is, változatos mértékben és összetételben fejezik ki az ErbB receptorcsalád tagjait, s ezek különféle aktivitású homo- és heterodimereket képezhetnek a membránban, a sejt környezetében található növekedési faktorok minősége és mennyisége jelentős befolyással lehet a sejt proliferációs vagy differenciációs folyamataira. Emiatt az aktivációs és transzaktivációs folyamatok, melyek az ErbB család tagjai között ligandum hatására létrejöhetnek, a figyelem középpontjában állnak. Különösen érdekesek lehetnek azok a megközelítések, melyek a receptorok aktivációját *in situ* az ép sejtben vizsgálják. Ezek során – többek között – megállapítható a jelátviteli folyamatok lokális vagy globális kiterjedése, vagy a receptor expressziós szint hatása a transzaktiválhatóságra. A paramágneses mikrogyöngyökön alapuló technikák időben és térben jól behatárolt stimulációt biztosítanak, így sokoldalú eszközként használhatóak ezekben a mérésekben.

Kísérleteink során trastuzumab- és EGF-konjugált mikrogyöngyöket használtunk az ErbB1 és ErbB2 aktivációjának és transzaktivációjának vizsgálatára. Ezek működőképességét először az A431 humán epidermális karcinóma sejtvonalból az ErbB2-mYFP kiméra génnel stabilan transzfektált A431-ErbB2-mYFP sejtvonalon vizsgáltuk. Ezek a sejtek $1,2 \cdot 10^6$ ErbB1, és $9,5 \cdot 10^5$ ErbB2 receptort fejeznek ki sejtenként. Az EGF-mikrogyöngyök elhelyezkedése, valamint az aktivált ErbB1-re és a foszfortirozinra specifikus mintázat közötti korreláció igen magas volt ($C=0,68$ és $C=0,57$). A trastuzumab-gyöngyök és a foszfo-ErbB2, ill. foszfortirozin jel között is erős korreláció volt ($C=0,68$ és $C=0,47$). Az utóbbi érték a foszforilációs szignál terjedése (citoplazmatikus adapterek diffúziója) miatt alacsonyabb. EGF-gyöngyök használata esetén az erős ErbB1 aktiváción túl ErbB2 transzaktivációt is tapasztaltunk ($C=0,43$). Trastuzumab-gyöngyökkel ErbB1 aktivációt nem tapasztaltunk az A431-re jellemző spontán aktivitáson túl, ez utóbbi miatt a C értéke $0,13$ volt.

Az EGF-mikrogyöngyökkel végzett stimuláció kizárólag foltszerű, a gyöngyök közvetlen környezetére terjedő ErbB1 aktivációhoz vezet. Trastuzumab gyöngyökkel szintén lokális ErbB2 aktivációs mintázatot figyeltünk meg, amely nem haladta meg a gyöngyök közvetlen környezetét. Az aktivációs kísérletek során egyes esetekben megfigyelhető volt a trastuzumab-gyöngyök internalizációja is, de aktivált receptorokat az ilyen esetekben is csak a gyöngyök közvetlen környezetében találtunk, az aktivációs zónán kívül elhelyezkedő receptor klaszterek inaktívak maradtak. A receptor jelenlétét mutató YFP fluoreszcencia és a foszfortirozin-specifikus fluoreszcencia arányát meghatározva azt $1,2 \pm 0,2$ -nek találtuk a gyöngyök közvetlen környezetében, míg az aktivációs zónán kívül ugyanezen fluoreszcenciaintenzítások aránya $6,8 \pm 1,4$ volt.

Az SKBR-3 jól ismert, ErbB molekulákat nagy számban (átlagosan $1,9 \cdot 10^5$ ErbB1 és $1,1 \cdot 10^6$ ErbB2 molekula sejtenként) kifejező, trastuzumab érzékeny emlőtumor sejtvonal. A trastuzumab rezisztencia *in vitro* vizsgálatára alkalmas, nemrég izolált emlőtumor sejtvonal, a JIMT-1 $8 \cdot 10^4$ ErbB1 és $6 \cdot 10^5$ ErbB2 receptort fejez ki sejtenként. Trastuzumabbal végzett ErbB2-expresszió meghatározása során azonban mindössze $8 \cdot 10^4$ ErbB2 mutatható ki sejtenként. A trastuzumab disszociációs állandója SKBR-3 esetén $2,5$ nM, JIMT-1 esetén 25 nM, tehát a trastuzumab kötődése gátolt a JIMT-1 sejteken. Ezzel összhangban az oldott trastuzumab alig indukál rajtuk ErbB2 foszforilációt. Viszont ha ugyanezeket a sejteket

trastuzumab-mikrogyöngyökkel stimuláltuk, közel olyan mértékű ErbB2 aktivációt tudunk kimutatni, mint SKBR-3 esetén. A mikrogyöngyök elhelyezkedése és a foszfo-ErbB2 aktivációs mintázata közötti korreláció SKBR-3 esetén $C=0,73$; JIMT-1 esetén $C=0,57$ volt. SKBR-3 sejtekben stimuláció hatására a foszforilált ErbB2 specifikus fluoreszcenciaintenzitás fokozódott azokban a régiókban ahová a trastuzumab, vagy a trastuzumab-mikrogyöngy kötődött, és emelkedett a foszfo-ErbB2 pozitivitást mutató pixelek aránya is. JIMT-1 esetén ezek a jelenségek trastuzumabbal borított mikrogyöngyök alkalmazása esetén hasonló mértékben voltak megfigyelhetőek, míg ha a trastuzumabot oldatban alkalmaztuk, jóval gyengébb ErbB2 aktivációt figyeltünk meg. Ez arra utal, hogy a JIMT-1 sejtek felszínén az ErbB2 funkcionálisan – trastuzumabkötő és transzfoszforilációs képességét illetően – ép, csak a trastuzumab kötőhelye, valószínűleg sztérikus hatások miatt, nehezen hozzáférhető. A mikrogyöngyök által biztosított nagy lokális ligandumsűrűség és mechanikai hatások viszont képesek legyőzni ezt a sztérikus gátlást. A gátlás egyik okaként a nagymértékben kifejezett MUC4 sialomucin komplex azonosítható.

Az SKBR-3 és JIMT-1 sejteken, hasonlóan az A431-ErbB2-mYFP-hez, a trastuzumab-gyöngyök nem aktiválták az ErbB1 receptorokat, a keresztkorrelációs érték a gyöngyök és az aktivált ErbB1 között 0,26 volt SKBR-3 és 0,16 JIMT-1 esetén. A trastuzumab oldatban szintén nem okozott ErbB1 aktivációt. Ebből arra következtethetünk, hogy a trastuzumab nem segíti elő ErbB2 tartalmú heterodimerek kialakulását és transzfoszforilációját.

Az EGF-gyöngyök mindkét sejtvonalon aktiválták az ErbB1 molekulákat, bár a JIMT-1 esetén csak kismértékben. A foszforilált ErbB1 szinteket jelző fluoreszcencia intenzitása nagyjából arányos volt a sejtek ErbB1 expressziós viszonyaival, míg a stimulált membránterületeken a specifikus intenzitásnövekedést mutató pixelek aránya $59\pm 22\%$ volt SKBR-3 sejteken és $43\pm 19\%$ JIMT-1 sejteken. Az ErbB2 molekulák transzaktivációja az EGF-gyöngyök alatt kimutatható volt SKBR-3 és JIMT-1 esetén is, de elmaradt az A431-ErbB2-mYFP sejteken megfigyelttől. A közel azonos ErbB2 szinteket figyelembe véve a transzaktiválhatóság valószínűleg a sejtvonalak eltérő ErbB1 expressziós szintjével arányos. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy a többfajta ErbB-t kifejező tumorok terápiája során a transzaktiváció gátlására is érdemes gondolni az expressziós szintek függvényében. Az ErbB1-et és ErbB2-t egyaránt kifejező daganatok esetén potenciálisan jól alkalmazható a 2C4 humanizált változata, a pertuzumab, mely jelenleg I. fázisú klinikai kipróbálás alatt áll, vagy a mindkét receptorra ható kinázgátlók.

Mára viszonylag sok kristályszerkezeti adat áll rendelkezésre az ErbB család tagjairól, de ezek csak az extracelluláris domén egy részére és az intracelluláris kináz doménre vonatkoznak. Emellett ismertek még az ErbB2 receptor immunterápiában használt antitestekkel (trastuzumab, pertuzumab) képzett komplexeinek kristályszerkezeti adatai is, így ezen két antitestnek pontosan tudjuk a kötődési helyét is. A majdnem teljes ErbB2 modelljének elkészítéséhez FRET méréseket végeztünk a molekula egyes építőpajai közti - molekulán belüli és molekulák közötti – távolságok megállapítására, valamint az építópok membrántól való távolságának a meghatározására.

A méréseket négy antitest felhasználásával végeztük: a 4D5, 2C4, 7C2 és F5 antitestekkel. A 4D5 monoklonális antitest humanizált változata a trastuzumab, a 2C4 humanizált változata pedig a pertuzumab. Az F5 scFv (egyláncú variábilis fragment) antitestet liposzómához kapcsoltn kívánják használni célzott gyógyszeres terápiában. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a négy jelölt antitest egymástól való (intramolekuláris) távolságait, valamint két ErbB2 molekulához kapcsolt ugyanazon antitest intermolekuláris (homodimerizációs) távolságait is. A FRET mérésekhez Cy3- és Cy5-jelzett antitestekkel jelöltünk magas ErbB2 expressziós szintű emlő- (SKBR-3) és gyomortumor (N87) sejteket.

Az eltérő epitópok közötti molekuláris távolság adatok alapján megállapítottuk, hogy a 4D5 és 2C4 antitestek végpontjai találhatóak legközelebb egymáshoz, míg a többi a kimutathatósági határ közelében, igen messze helyezkedik el egymástól. A később meghatározott ErbB2-2C4 kristályszerkezet lehetőséget adott arra, hogy a két Fab fragmentumot molekuláris modellezéssel egy ErbB2 molekulához illesszük. A modelltől meghatározott 4D5-2C4 távolság 9,57 nm volt, jóval nagyobb, mint a mérési eredményekből számolt 6,2 nm. Ebből arra következtethetünk, hogy a 4D5 és 2C4 közötti transzfer eredményekben nem csak intra-, de intermolekuláris kölcsönhatások is megjelennek, amik áramlási citométeres módszerekkel nem oldhatók fel. Ez összhangban áll azzal, hogy 4D5-2C4 FRET hatásfok sejtenkénti eloszlás hisztogramja lényegesen szélesebb, mint a kicsit alacsonyabb átlag transzferhatásfokú 4D5-7C2 eloszlási hisztogram.

Az azonos epitópok közötti (intermolekuláris) transzferhatásfok (7 – 14 %) és távolság (6,8 – 7,7 nm) értékek igen hasonlóak voltak. Elméleti megfontolások alapján ez kétféleképpen magyarázható: egyrészt elképzelhető, hogy az antitestek végén elhelyezkedő festék molekulák a receptor egyik „oldalára” esnek, így a receptor felszínét követik egy bizonyos távolságra, másrészt az is lehetséges, hogy az antitestek a receptor több oldaláról állnak ki, s így valójában három vagy több receptor közötti kölcsönhatásokat reprezentálnak.

Az F5 scFv található legközelebb a membránhoz (4,7 nm), míg a 2C4 és 7C2 közepesen (6,0, ill. 6,2 nm), a 4D5 pedig meglehetősen messze (7,4 nm) helyezkedik el a membrántól. Ezeket a távolság adatokat később részben alátámasztotta az ErbB2 ektodomén 4D5 és 2C4 Fab fragmentumokkal képzett komplexeinek kristályszerkezete. A további molekulamodellezési számításokat ezekre a koordinátákra, valamint a 4D5 Fab' antitest távolság adataira alapoztuk, mivel a 2C4 szerkezeti adatok alapján gátolja a homo- és heterodimerek képződését, az F5 scFv antitestnek pedig kicsi az affinitása és erősen kompetál a többi antitesttel.

A molekulamodellezési számításokat a FRET mérések, kristályszerkezeti adatok, és molekulászerkezeti adatbázisokban talált homológ szerkezetek alapján végeztük. A majdnem teljes hosszúságú ErbB2 dimer tartalmazta a teljes ektodomént, a külső membránközeli régiót, a transzmembrán domént, a belső membránközeli régiót, a protein kináz domént és a szabályozó szerepet betöltő C-terminális farkok egy részét. Ez az ErbB2 homodimer, a többi ErbB molekula ligandummal kapcsolt formájának szerkezetét is figyelembe véve, kiindulási modellként szolgálhat az ErbB2 molekula ErbB család többi tagjával alkotott heterodimerjeinek megszerkesztéséhez.

A homodimer szerkezete három potenciális kölcsönhatási felszínnel rendelkezik: az ektodomén dimerizációs hurkai, a transzmembrán hélixek, és a kináz domének. A modellépítés során a két kináz domén elhelyezkedését kizárólag a transzmembrán és a belső membránközeli domének dimerjei szabták meg, mégis, meglepő módon az ezekhez illesztett két kináz domén szabályos és szimmetrikus, egymásnak *háttal* álló dimert alkotott. Az egymásnak háttal álló kináz domének képesek lehetnek a citoplazmatikus szabályozó farkrész *transz*-foszforilációjára, de egymás foszforilációjára nem. Így feltételezhető, hogy, a kináz domének foszforilációjához legalább egy, a dimerhez kapcsolódó másik ErbB családbeli kináz szükséges. Figyelembe véve azonban, hogy ezen másik kináznak is feltehetőleg aktivált állapotban kell lennie, könnyen elképzelhető, hogy egy másik ErbB dimer transzfoszforilálja a kináz doméneket. Jelenleg folyó modellezéseink alapján úgy tűnik, hogy egy ErbB2 dimerekből álló tetramer két különböző konformációban is kielégíti ezt a feltételezést. Ugyanakkor a dimerek dimerjeit, vagy ennél is magasabb rendű oligomereket feltételező aktivációs mechanizmus az ErbB2 molekulák daganatsejtek membránjában észlelhető nagyfokú aggregációját, lipid tutajokban történő bedúsulását is magyarázza.

A fenti mérések során alkalmazott energiatranszfer mérési (FCET) módszert eredetileg egy klasszikus áramlási citométerre fejlesztették ki, ami 488 és 514 nm lézergörgetéssel

rendelkezett, és az előszeretettel használt fluoreszcien - rodamin festékpár detektálására volt alkalmas. Az újabb citométer rendszerekben, melyek általában 488 és 635 nm lézergörjesztést használnak, a fluoreszcien és rodamin pár már nem alkalmazható, mivel a 635 nm-es gerjesztés a rodamin színképtartományán kívül van és a 635 nm-en gerjeszthető festékeknek a fluoreszcienel képzett spektrális átfedése olyan kicsi, hogy az energiatranszfer gyakorlatilag nem történik meg. Ugyanakkor számos új fluorofor jelent meg a sejtbiológiai alkalmazások terén, melyek alkalmasak az újabb citométerekben FRET mérésére. Ezek használhatóságának meghatározására négy paramétert találtunk relevánsnak: a normalizált fluoreszcencia intenzitás (I_{norm}), spektrális átfedési integrál (J_{DA}), normalizált energiatranszfer hatásfok (E_{norm}) és az efr együttható.

Az azonos számú festékre vonatkozó normalizált fluoreszcencia intenzitás értékeket (I_{norm}) úgy kapjuk meg, hogy az átlag fluoreszcenciás jelből először levonjuk az átlag háttér intenzitás értékeket, majd elosztjuk a festék-fehérje jelölési aránnyal (L). A J_{DA} átfedési integrál a festékek színképeiből számítható ki. Ahhoz, hogy az egyes festékpárokra kapott E értékeket összehasonlíthassuk, normalizálni kell azokat a jelölési donor-akceptor arányra: az E_{norm} számítására olyan biológiai rendszeren alapuló algoritmust állítottunk fel, ahol ez az arány 1 (pl. MHC I molekulák nehéz és könnyű lánc). Az efr együttható a festékek donor gerjesztési hullámhosszon vett moláris abszorpciós együtthatóinak arányaként számolható (ϵ_D/ϵ_A). Ezt a fizikai paramétert nem lehet megbízhatóan meghatározni a festékek elnyelési színképe alapján, viszont arra lehetőség van, hogy a FRET hatásfokot meghatározzuk, majd az efr faktort úgy változtassuk, hogy a transzferhatásfok értéke megegyezzen a donor kioltással számolt (antitest kompetícióra korrigált) értékkel.

Mindezen adatokat a Cy3, AlexaFluor488, AlexaFluor546, AlexaFluor555, AlexaFluor568 donorként, valamint Cy5, AlexaFluor633 és AlexaFluor647, akceptorként alkalmazható fluorofórokra, ill. a belőlük alkotott párokra a három tesztelt áramlási citométeren megmérve a donor festékek közül az AlexaFluor546 és AlexaFluor555 bizonyult a legjobbnak. Alacsony antigén-szám esetén a jel/zaj viszony alapján az AlexaFluor546 a jobb FRET donor jobb kvantumhatásfoka miatt. Egy akceptor festék esetén a donor fluoreszcencia csatornába való átvilágítás és az átfedési integrál a fontosabb. Ez alapján a Cy5 a legjobb, míg az AlexaFluor633 a legrosszabb FRET akceptor, és az AlexaFluor647 igen hasonló a Cy5-höz. Az egyedüli oka, hogy a Cy5-öt kevésbé jó festéknek tartjuk, az alacsony kvantumhatásfoka és gyenge fotostabilitása. Páronként megvizsgálva az AlexaFluor555-Cy5 és az AlexaFluor546-AlexaFluor647 festékpárok rendelkeznek a legkedvezőbb jellemzőkkel. Az első pár rendelkezik a legnagyobb átfedési integrállal, és ezzel kaptuk a legnagyobb FRET hatásfok értéket, míg az utóbbi festékpárral mértük a legmagasabb fluoreszcenciás jeleket. Mivel a fluoreszcenciás mérésekben a fluoreszkáló festék gerjeszthetősége és detektálhatósága a legfontosabb, ezért áramlási citometriás energiatranszfer kísérletekhez az AlexaFluor546-AlexaFluor647 festékpár a legmegfelelőbb. Ugyanakkor egyes mikroszkópos technikákban a fluoreszkáló festékek fotodestrukciója is fontos, így akceptor fotoelhalványításos FRET méréseknél az AlexaFluor555-Cy5 a legjobb választás. A fotoelhalványításos méréseket kitapadva növekvő sejtek vizsgálatakor különösen alkalmasnak találtuk a fiziológiás morfológia megőrzésére, beleértve az adhéziós struktúrák és a hozzájuk köthető kináz aktivitás épségét. Az elemzések megkönnyítésére házi képfeldolgozó programokat készítettünk ezekhez a mikroszkópos mérésekhez.

A közelmúltban néhány megfigyelés azt sugallta, hogy a chaperonok, köztük a Hsp90 szerepe túlterjed a dajkált fehérjék molekuláris konformációjának megőrzésén, részt vehetnek azok működésének szabályozásában is. Western blot kísérletekben, a lízis pufferben keresztkötő ágenszt alkalmazva kimutattuk, hogy a Hsp90-t gátló geldanamycin hatására SKBR-3 emlőtumor sejteken fokozódik a heregulin kezelésre kialakuló ErbB2-ErbB3 heterodimerek mennyisége, és az ErbB3 foszforilációja. Mikroszkópos FRET mérések

megerősítették, hogy SKBR-3 sejteken 17-AAG (17-allilamino-17-demetoxigeldanamicin, egy fokozott membránpenetranciájú geldanamicin analóg) időfüggő módon fokozza az ErbB2-ErbB3 dimerek képződését. EGF kezelésnél hasonló megfigyeléseket tettünk: fokozódott az ErbB1-ErbB2 dimerek mennyisége és mindkét receptor foszforilációja is. Az ErbB2 specifikus, az ErbB családban csak rá jellemző Hsp90 kötőhelyének kicserélése az ErbB1 homológ, de Hsp90-et nem kötő szekvenciájával fokozta az ErbB2 spontán dimerizációs készségét és foszforilációját.

SKBR-3 sejtekben a Hsp90 gátlása fokozta az ErbB2 internalizációját, de heregulinnal együtt alkalmazva a sejtmembránból keresztkötéssel izolálható ErbB2 homodimerek mennyisége csökkenést mutatott. Az SKBR-3 sejtek egyaránt fejeznek ki ErbB2-t és ErbB3-t, melyek közös klaszterekben helyezkednek el. FRET mérésekkel igazolható, hogy ezekben a klaszterekben az ErbB2 homodimereket és az ErbB3-mal heterodimereket is képez. Mindezek alapján feltehető, hogy a Hsp90 a membránban dimer formában stabilizálja az ErbB2-t, s ezen dimerekben az ErbB2 kináz aktivitása csekély mértékű. A Hsp90 gátlása önmagában két folyamatot tesz lehetővé. Egyrészt az ErbB2 dimerek kináz doménjei felszabadulnak a gátlás alól, az ErbB2 transzfoszforilálódhat, és internalizálódik. Másrészt az ErbB2 asszociálódhat további ErbB kinázokkal - az SKBR-3 esetén az ErbB3-mal - és foszforilálhatja őket. Mivel a heregulin az ErbB3 specifikus liganduma, ha a Hsp90 gátlásával egyidejűleg heregulint is adunk a sejtekhez, az utóbbi, ErbB2-ErbB3 dimerizációs folyamat lesz a domináns, és az ErbB2 homodimerek mennyisége csökken. Eredményeink jól magyarázzák azt a mechanisztikus megfigyelést, hogy az ErbB2 az ErbB receptorcsalád egyetlen olyan tagja, amelynek internalizációja nehezen megy végbe, és elkerüli a klatrinburkos csapdákat. A megfigyelésnek potenciális terápiás vonatkozása is van, hiszen a 17-AAG mint chaperongátló klinikai kipróbálásig jutott számos daganat terápiájában. ErbB2-t nagymértékben kifejező daganatokban a Hsp90 17-AAG általi gátlása fokozhatja az ErbB2 internalizációját, ami kívánatos lehet, ha degradáció követi, ugyanakkor a 17-AAG fokozhatja az ErbB2 foszforilációját, aktivációját is, valamint, ha az ErbB család további tagjai is jelen vannak, serkentheti aktív ErbB2 heterodimerek képződését is.

Ezt a feltételezést alátámasztják azok a kísérletek is, melyben a trastuzumab rezisztens és szenzitív emlőtumor sejtek proliferációját vizsgáltuk 17-AAG, trastuzumab és azok kombinációja jelenlétében. A trastuzumab rezisztens sejteken az ErbB2 nyugalmi foszforilációs szintje lényegesen alacsonyabb volt a szenzitív sejtekénél, és trastuzumab általi aktivációja és leszabályozása is. Ezzel szemben a 17-AAG ezekben a sejtekben is hatékonyabban fokozta az ErbB2 homodimerizációt, és 70 nM (szenzitív, SKBR-3), ill. 10 nM (rezisztens, JIMT-1) IC_{50} értékkel gátolta mindkét sejt proliferációját, s a gátlás korrelált az ErbB2 foszforilációs szintjével és leszabályozásával. A proliferáció gátlás mechanizmusa javarészt apoptózisnak bizonyult. Mivel az ErbB2 leszabályozás és foszforiláció félhatékony dózisa mindkét sejtvonalon 30-40 nM volt, míg a proliferációt gátló hatás fordítva korrelált az ErbB2 expressziós szinttel, feltételezzük, hogy az ErbB2 17-AAG általi aktivációja az internalizáción kívül túlélési utakat is megindít, melyek a globális citosztatikus hatást részben kivédik. Ugyanakkor a magas ErbB2 expressziójú szenzitív sejteken a 17-AAG kezelés kiegészítése a trastuzumab szokásos 40 μ g/ml-es dóziséval – bár a 17-AAG IC_{50} értékét nem változtatta meg – csökkentette az ErbB2 foszforilációs szintjét, és alacsony 17-AAG dózisonál hatékonyan fokozta a 17-AAG okozta sejtpusztulást, így a trastuzumab-17-AAG kombinációs terápia ígéretes lehet a magas ErbB2 expressziójú tumorok esetén.

Az EGFR, vagy ErbB1 számos emlőtumorban mutat fokozott kifejeződést, és így nagy mitogénikus aktivitású ErbB homo- és heterodimerek alkotója lehet. Mint új antitest terápia (Erbbitux, cetuximab) célpontja, internalizációja, leszabályozása fontos kérdés. Bár az ubikvitinálás ismert internalizációs és lebontási jel, kérdéses, hogy az ErbB1 internalizációjához elegendő-e az ubikvitinálás. Kísérleteinkben azt tapasztaljuk, hogy az

ubikvitin és c-Cbl vektorokkal transzfektált CHO sejtekben az ErbB1 EGF kezelés hatására foszforilálódott és ubikvitinálódott. Az ErbB1 Y1045F mutánsa, mely nem képes a c-Cbl megkötésére még foszforilált állapotban sem, nem, vagy csak nagyon kevésbé volt képes internalizálódni CHO sejtekben. Azonban ha a C-terminális végére egy monoubikvitin volt fuzionálva, internalizációja felgyorsult, még akkor is, ha a monoubikvitin a 75. és 76. glicinjének alaninra történt mutációja miatt nem volt megfelelő kiindulási pontja egy esetlegesen hozzákötendő poliubikvitin láncnak. Ha a sejtekbe akár elágazásra képtelen, akár vad típusú ubikvitint transzfektáltunk, az ErbB1 EGF hatására azonos foszforilációs és ubikvitinációs mintázatot mutatott, és gyorsan internalizálódott, alátámasztva, hogy élő sejtben a többszörös monoubikvitináció az ErbB1 internalizációjának és degradációjának kiváltója. Irányított mutagenezis segítségével azt is megállapítottuk, hogy a folyamat megindításáért felelős első ubikvitint a c-Cbl a tirozinkináz-domén valamelyik lizinjéhez kapcsolja. Tekintve, hogy egyetlen ubikvitin is elegendőnek tűnik az ErbB1 internalizációjához, feltételezzük, hogy a többszörös monoubikvitináció fokozza az internalizációs adapter fehérjék (pl. eps15) kötődésének aviditását, s ugyanakkor hatékonyabban biztosítja, hogy az internalizált receptor elkerülje a proteaszómát.

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia alapjait E. Elson és R. Rigler fektették le a hetvenes évek közepén. A lézerek és detektorok technikai fejlődése csak később tette lehetővé, hogy ez a nagy érzékenységet és időben állandó intenzitású gerjesztést megkívánó módszer terjedni kezdjen. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy alkalmas lehet-e a fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia – amennyiben a konvencionális fluoreszcenciás mikroszkóp képalkotásával kombináljuk – élő sejtek molekuláinak tanulmányozására az egyes szubcelluláris kompartmentekben. A fluoreszcensen jelölt interleukin 2 és 15 receptorokkal, valamint MHC fehérjékkel végzett modellkísérleteket követően az ErbB1-eGFP fúziós génjével stabilan transzfektált CHO sejteket vizsgáltunk, melyekben a kiméra receptor működőképességét a receptor tirozin foszforilációja és az EGF által kiváltott kalcium tranziens alapján bizonyítottuk. A konfokális térfogatelemből származó jel detektálása igen nagy érzékenységgű volt, egyedi molekulák diffúziója is láthatóvá vált.

Az autokorrelációs függvény illesztésében egy gyors és egy lassú diffúziós komponens, továbbá az eGFP triplet állapotát is figyelembe véve a sejtek három kompartmentjében – a membránban, a citoplazmában, és az endoplazmatikus retikulumban – jellemeztük a fúziós ErbB1 mobilitását. A membránreceptorok tanulmányozása szempontjából az egyik legfontosabb információ az, hogy a membrán síkjára fókuszált konfokális térfogat esetén is jelentős, 35%-nyi gyors komponens mérhető, melynek diffúziós állandója jól egyezik a szabad citoplazmatikus GFP diffúziós állandójával ($1,7 \pm 0,4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$), amit a GFP-vel tranziensen transzfektált sejtekben mértünk. Ugyanez a gyorsan diffundáló molekulatípus nagy arányban (78%) található, ha a mérést a citoplazmába fókuszálva végezzük. Figyelemre méltó, hogy a membránban tapasztalt $1,6 \pm 0,9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ -os diffúziós állandó sokkal nagyobb, mint a korábban FPR (fotokioltság utáni fluoreszcencia visszatérés) mérések alapján az ErbB1-re megállapított értékek (A431 sejteken $4,5\text{-}8,2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, fibroblasztokon $1,8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, keratinocitákon $4,1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$). Saját FPR méréseink az F1-10 sejteken szintén $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ diffúziós állandót eredményeztek, tehát nem valószínű, hogy a különbséget a fúziós fehérjében megjelenő eGFP okozná. Úgy véljük, hogy a sejtmembrán doménszerkezete, az ErbB receptorok klaszteres eloszlása – beleértve az ErbB1-eGFP klaszteres eloszlását is – magyarázza legjobban a jelenséget. Az FCS mérések során egy kis térfogatelemben mértünk, és a klaszteren belüli és/vagy a klaszteren kívüli lokális diffúziót jellemző értéket kapunk. Ezzel szemben a FPR mérések során a kiégetett folttól távolabb eső területekről a foltba diffundáló molekulák mobilitását jellemezzük, s ezeknek a molekuláknak egy vagy több doménhatárt kell átlépniük ahhoz, hogy bekerüljenek a kiégetett foltba, ami lassítja, ill. anomálissá teszi diffúziójukat.

Az előzőekben ismertetett kísérleti tapasztalatok, valamint az irodalomban felhalmozódott ismeretanyag arra késztet, hogy három évtized elteltével újragondoljuk a Singer-Nicolson féle folyékony mozaik membránmodellét. A kísérleti adatok, melyek nem támasztják alá a Singer-Nicolson membránmodellét, a következők: (i) a receptorok eloszlási mintázata nem véletlenszerű a plazmamembrán különböző szerveződési szintjein; (ii) tartós molekuláris kölcsönhatások a citoskeletális elemekkel és jelátviteli molekulákkal; (iii) rövidebb akadálymentes úthossz, mint amit szabad diffúzió esetén várnánk; (iv) a membrán lipidkomponenseinek doménstruktúrája lehetővé teszi, hogy bizonyos membránfehérjék szeparálódjanak, vagy egy helyre csoportosuljanak; (v) a transzmembrán fehérjék fellelhetősége a membrándoménokban arra utal, hogy a membránszerkezet fenntartásában a fehérjék legalább olyan fontos szerkezeti elemek, mint maguk a lipidek; (vi) az adekvát sejtválaszokat a fehérjék membrándomének közötti dinamikus átrendeződése teszi lehetővé, melyet protein-lipid és protein-protein kölcsönhatások szabályoznak.

A fentiek miatt a Singer-Nicolson modell nem alkalmazható közvetlenül a membránban lejároló folyamatok leírására, új koncepció bevezetése látszik szükségesnek, mely a membránfehérjék kolokalizációjára, komobilitására és nem véletlenszerű eloszlására helyezi a hangsúlyt. Ennek elemei a következők: (i) a sejtfelszíni (transzmembrán, glikozil-foszfatidilinozitolhoz kötött, és egyéb) fehérjék mozgását lipid domének elkülönülése korlátozza, valamint azok a határok, melyekbe diffúziójuk során ezek a fehérjék ütközhetnek; (ii) a membránfehérjék homogén, vagy változatos összetételű molekuláris szintű csoportokat alkothatnak, ami a Singer-Nicolson modellből a „mozaik” koncepcióját teszi hangsúlyossá; (iii) a fehérjék szerveződésének létezik egy második hierarchikus szintje is, mely számos protein néhány száz nm-es klaszterekben való rendeződésében nyilvánul meg; (iv) a fehérjék vagy fehérjecsoportok gyakorta lipid tutajokban helyezkednek el a membránban, és/vagy annak két oldalán ható erők hatására; (v) egyes receptortípusok (pl. TNF és IL receptorok) alegységei a fiziológiás ligandum hiányában is összeszerelődött receptorkomplexet alkotnak a membránban, melyben ligandkötés hatására az alegységek kölcsönhatása még szorosabbá válik; (vi) a ligandkötés hatására bekövetkező receptor di-, és oligomerizáció (pl. az ErbB család tagjai esetében) szintén fontos dinamikus szerveződési folyamat, melyben a környezet ligandum-összetétele jelentősen befolyásolhatja a jelátvitel kimenetelét; (vii) a legkisebb mikrodomének tartalmazhatnak akár csak egy-egy fehérjét, vagy funkcionális oligomert és annak közvetlen lipid környezetét; a nagyobb szignalizációs egységek, pl. az immunszinapszis, ilyen egységdoménokból épülnek fel; (viii) a transzmembrán fehérjék alfahelikális transzmembrán doménje hosszát, és alakját tekintve illeszkedik az öt legnagyobb affinitással befogadó lipid régió alifás oldalláncai és koleszterin tartalma által meghatározott fizikai-kémiai környezethez; (ix) a fehérjék különböző membrándoménokban való elhelyezkedését a specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásokon keresztül genetikailag megszabja a transzmembrán domén aminosavszekvenciája, és azok szekvenciaspecifikus kovalens módosulásai; (x) a fehérjék szerepe a membrándomének alkotóelemeinek, szerkezetének, és dinamikájának meghatározásában legalább olyan fontos, mint a lipideké; (xi) míg a mesterséges lipid kettősrétegekben spontán elkülönülő struktúrák alakulnak ki, az élő sejt membránjában a lipid-lipid kölcsönhatásokon kívül a protein-lipid, illetve protein-protein kölcsönhatások, és érzékenyen szabályozott vezikuláris transzportfolyamatok biztosítják, hogy ne csak szerkezet, de dinamikusan szabályozható szerkezet alakuljon ki; (xii) a mikrodomének és receptor szuperstruktúrák eredetének és jellemzőinek meghatározása segítségünkre lehet a sejtek aktivációs állapotának és reaktivitásának vizsgálatában. Ezek az információk diagnosztikai, prognosztikai, vagy akár terápiás jelentőséggel is bírhatnak, ha a receptorok eloszlási mintázatait hozzá tudjuk rendelni különféle kóros állapotokhoz, vagy a sejtek megváltozott genetikai állományához.

A fenti megállapítások fényében be kell látnunk, hogy a sejtmembrán biológiai tulajdonságai bonyolultabbak, mint amit egy egyszerű, általánosító, a membránban elhelyezkedő molekulák azonos viselkedésére alapozott modell le tud írni. A Singer-Nicolson modell, bár megszorításokkal, de érvényesnek tekinthető: szabad diffúzió van, de csak a membrándomének határain belül, ahol a molekuláris interakciók nem akadályozzák. Ez azt jelenti, hogy a hangsúlyt a folyékonyságról a mozaikosságra kell áttenni. A szabad diffúziót behatárolja (i) a lipid domén struktúra, (ii) a citoskeletális és más citoszolikus molekuláris kapcsolatok, és (iii) a transzmembrán fehérjék homo- és heteroasszociációi. Ezek az interakciók lehetőséget adnak az intermolekuláris kapcsolatok időtartamának növelésére, így a két- vagy többoldalú interakciók valószínűségének fokozására, amit néha egyszerűen csak a jelátviteli utak átfedéseként emlegetünk. A fenti megkötések mellett tehát a membrán alkotóelemei valóban mobilisnak tekinthetőek, de e szervezőerők a membránt mégis erősen kompartmentalizált szerkezetűvé teszik, mely inkább mozaik, mint folyékony jellegű. A membrán síkjában a diffúzió, az intermolekuláris erők, a megváltozó membránpotenciál, és az extracelluláris hatások alakítják ki, vagy rombolják le a dinamikusan szerveződő szupramolekuláris struktúrákat. Ennélfogva a továbbfejlesztett Singer-Nicolson modell neve „dinamikusan strukturált mozaik modell” lehetne.