

RÉSZLETES BESZÁMOLÓ

Az OTKA által támogatott konzorcium működésében az Uzsoki utcai Kórház feladata a szövetszövetminták gyűjtése, előzetes feldolgozása, ill. a betegek utánkövetése, valamint az utánkövetésre alkalmas informatikai háttér megteremtése és fejlesztése volt. A Debreceni Egyetemen történt a metszetek jelölése, mikroszkópos elemzése és kiértékelése, valamint az egyéb sejtbiológiai és biofizikai kísérletek végrehajtása.

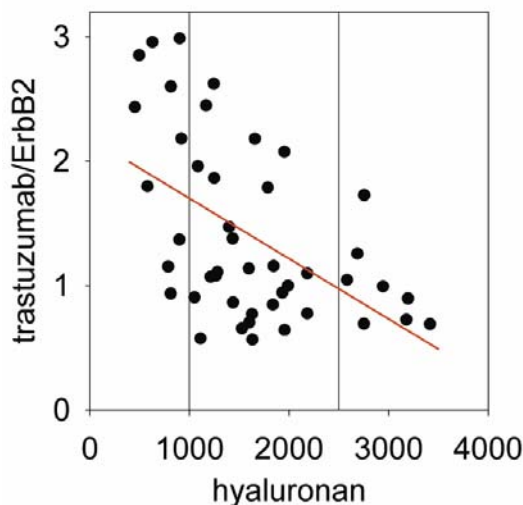
A részletes beszámolót a két kutatóhelyre vonatkozóan elkülönítve mutatjuk be.

Debreceni Egyetem

1. A pericelluláris hialuronsav humán emlőtumor sejtekben is gátolja a trastuzumab kötődését

Korábbi kutatásaink során megállapítottuk, hogy a trastuzumab rezisztencia egyik oka az ErbB2 antitestkötő epitópjának maszkírozása lehet, és *in vitro* és állatkísérletek alapján a MUC-4 transzmembrán mucinról és a hialuronsavról kimutattuk, hogy részt vesz a maszkírozásban. Jelen vizsgálatainkban a hialuronsav ezen szerepét kívántuk humán emlőtumor mintákon megerősíteni.

Ehhez kifejlesztettünk egy olyan képanalízis eljárást, amely képes a sejtmembrán azonosítására, és a membránon belül az ErbB2-re normalizált trastuzumab kötődés meghatározására, amit korreláltat a környező pericelluláris hialuronsav mennyiségével. A Matlab-ban írt program felhasználásával az Uzsoki utcai Kórháztól kapott emlőtumor mintákon bizonyítottuk, hogy a hialuronsav denzitás negatívan korrelál a trastuzumab kötődés mértékével (1. ábra).



1. ábra. A hialuronsav gátolja a trastuzumab kötődését.

Az emlőtumor metszeteket fluoreszcens jelöltünk háromféle antigén ellen: ErbB2 intracelluláris doménje (amely az ErbB2 mennyiségét jelentette), a fluoreszcens trastuzumab és fluoreszcens HABC (hyaluronic acid binding complex). A metszetek konfokális mikroszkópos vizsgálata és a képek kiértékelése után korreláltattuk egymással az ErbB2-re normalizált trastuzumab kötődést és a pericelluláris hialuronsav mennyiséget. A piros vonal a pontokra illesztett egyenes jelöli.

A maszkírozás további bizonyítására a metszeteket hialuronidáz emésztésnek vetettük alá, ami a trastuzumab kötődésének fokozódásához vezetett. További kísérletekben bizonyítottuk, hogy az 1. ábrán látható negatív korreláció nem lehet spektrális átfedés vagy fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) következménye. Az eredmények összességében meggyőzően bizonyították, hogy a pericellulárisan elhelyezkedő hialuronsav gátolja a trastuzumab kötődését az antitest kötő epitóp maszkírozása által [1].

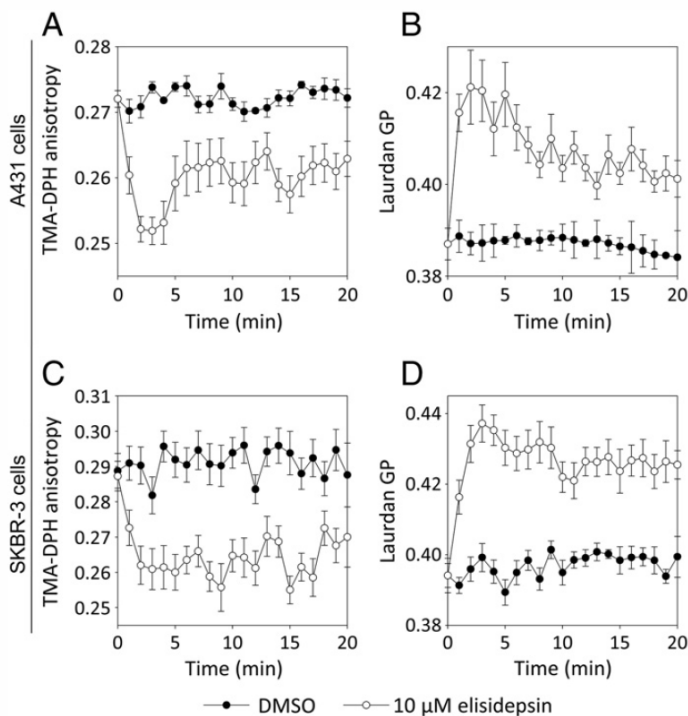
2. Az elisidepsin támadáspontja a sejtmembrán lipid tutaj komponense

Sikeresen tanulmányoztuk spanyol kollaborációs partnerünk (C. Galmarini, Pharmamar, Spanyolország) által rendelkezésünkre bocsátott, új támadáspontú kemoterápiás szer, az elisidepsin (Irvalec®) hatásmechanizmusát. Korábbi irodalmi adatok közvetetten arra utaltak, hogy a gyógyszer az ErbB fehérjékre, elsősorban az ErbB3-ra hat. Ezért az ErbB fehérjéket ki nem fejező CHO sejtekbe stabilan transzfektáltunk ErbB2-t és

ErbB3-at (az így létrehozott sejtvonalak: CHO-ErbB2, CHO-ErbB2-ErbB3), és összevetettük elisidepsin iránti érzékenységüket. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést az IC50 értékekben. Szintén nem volt hatása az ErbB2 vagy ErbB3 expressziónak akkor, ha A431 sejtekbe (melyek jelentős endogén ErbB1 expresszióval rendelkeznek) transzfektáltuk őket. A431 és SKBR-3 sejtek ErbB3 expressziójának RNS interferencia segítségével történő gátlása szintén nem befolyásolta számottevő mértékben a sejtek elisidepsin iránti érzékenységét. Ezért következtetésünk szerint az ErbB1-3 fehérjék expressziója nem befolyásolja jelentősen a sejtek elisidepsin iránti érzékenységét.

Ugyanakkor az elisidepsin az ErbB3 sejten belüli eloszlását módosítja. Ha ErbB3-citrine-nel transzfektált A431 sejteket vagy CHO-ErbB2-ErbB3 sejteket (amin később az ErbB3-t immunfluoreszcencián festettük) elisidepsinnel kezeltünk, a gyógyszer az ErbB3 klaszterizációját és internalizációját váltotta ki. Ugyanakkor az elisidepsin sem az ErbB1, sem az ErbB2 eloszlására nem volt semmilyen hatással.

Az elisidepsin jelentősen befolyásolta a lipid tutajok struktúráját és eloszlását. Erre a következő bizonyítékok utalnak: a. A431 sejtekbe transzfektált, lipid tutajokban dúsuló GPI-kapcsolt GFP gyorsan klaszterizálódott és internalizálódott elisidepsin kezelést követően. b. Hasonló viselkedést mutatott az A431 sejtek egyik endogén, lipid tutaj asszociált fehérjéje (PLAP – placental alkaline phosphatase). c. A431 és SKBR-3 sejteket TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia próbával jelöltünk meg. Elisidepsin kezelést követően a sejtmembránban a TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiája csökkent. d. A membrán hidratáltságát jellemző Laurdan fluoreszcens próba GP (generalizált polarizáció) paramétere a fenti két sejttypusban elisidepsin hatására növekedett (2. ábra). A c-d. pontokban leírt változások az elisidepsin mintához adása után 1-2 perccel megjelentek, utalva arra, hogy ezek lehetnek a gyógyszer által okozott elsődleges változások (és a többi, pl. általunk is tapasztalt, ErbB3-ra kifejtett hatások csak másodlagosak). Az anizotrópia csökkenése és a GP paraméter növekedése együttesen a lipid tutajok indukciójára, szerkezetük átalakulására utal. Ezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az elisidepsin elsődleges támadáspontja a sejtmembrán lipid tutaj mikrodoménje [2].

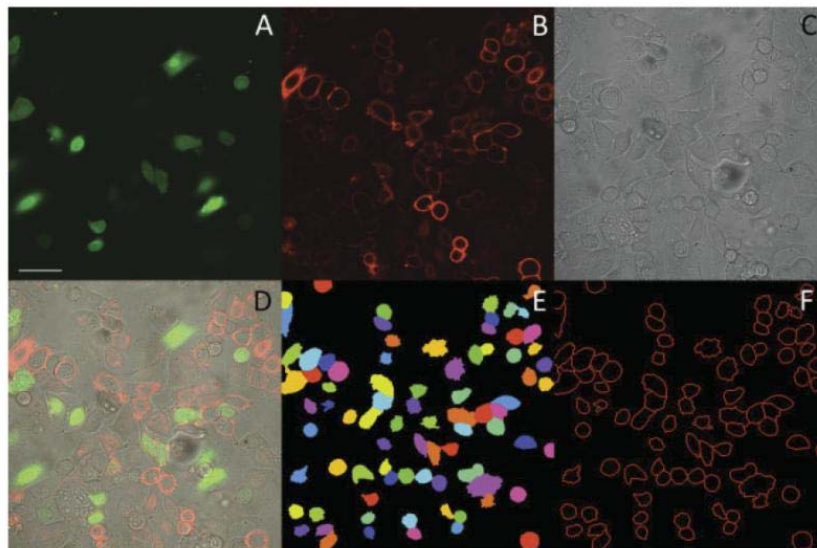


2. ábra. A TMA-DPH anizotrópia és a Laurdan GP értékének változása elisidepsin hatására A431 és SKBR-3 sejteken.

A TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópiáját (A,C) és a Laurdan generalizált polarizációját (B,D) mértük a két feltüntetett sejtvonalon 10 μM elisidepsinnel történő kezelést követően. Kontrollként az elisidepsin oldószerét, a DMSO-t használtuk. Az átlag±SEM értékeket tüntettük fel három független mérés alapján.

3. A lipid tutajok magas denzitása gátolja a lipofekció hatékonyságát

Vizsgálatainkhoz gyakran van szükség fluoreszcens fehérjék nehezen transzfektálható primér sejtekbe ill. sejtvonalakba történő bevitelére. Ezért részletesen megvizsgáltuk, hogy milyen okok állhatnak ezen sejtek nehéz transzfektálhatósága mögött. A sejteket Lipofectamine2000 transzfekciós ágens segítségével transzfektáltuk GFP-t kódoló plazmiddal, majd két nap múlva a lipid tutajok GM1 gangliozid tartalmát a kolera toxin B alegységének (CTX-B) fluoreszcensen jelölt változatával festettük meg. Eredményeink szerint a sejtek lipid tutaj tartalma (ill. GM1 gangliozid tartalma) negatív korrelációt mutat a sejtek lipid segítségével történő transzfektálhatóságával (3. ábra). Ez a korreláció mind egy sejtvonal esetében sejtenként, mind az egyes sejtvonalak összehasonlításakor megnyilvánult, de elektroporáció esetén nem volt jelen. Fluoreszcens plazmiddal végzett kísérleteink szerint a magas lipid tutaj tartalmú sejtekben a lipoplex (plazmid és transzfekciós ágens komplexe) felvétele blokkolt. Ezen eredményeink rávilágítottak arra, hogy bár a legtöbb esetben az elfogadott elmélet szerint a transzfekció sikerét meghatározó lépés a DNS endoszómából történő kiszabadulása, abban az esetben, ha a plazmid felvétele jelentős mértékben gátolt, ez is lehet a sebesség meghatározó lépés [3].



3. ábra. A sejtek CTX-B festődése szigorú antikorrelációt mutat a GFP transzfekció hatékonyságával.

A sejtek GFP expresszióját (A) és CTX-B (B) festődését, a fázis kontraszt képet (C) és ezek egymásra rétegzését (D) mutatja az ábra. A sejteket (E) és membránjukat (F) Matlab alatt futó, vízfeltöltéses („watershed”) algoritmust használó eljárással azonosítottuk. A képek két nappal a transzfekció után készültek. A méret indikátor 10 μm -nek felel meg.

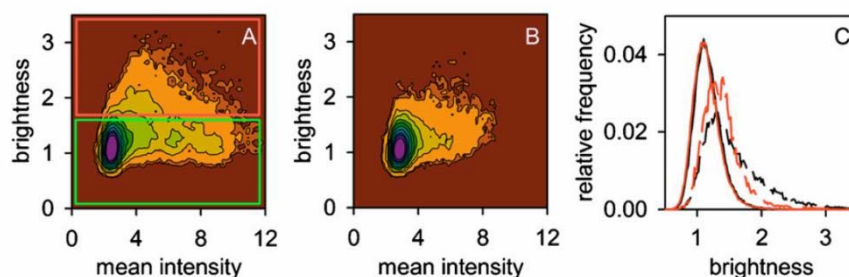
4. FRET alapú módszer kidolgozása és alkalmazása ErbB fehérjék klasztereinek sztöchiometriájának meghatározására

Jelentős előrehaladást értünk el az ErbB fehérjék klaszterizációjának kvantitatív leírásában. Egyrészt kifejlesztettünk egy új módszert (FSAB – FRET-sensitized acceptor bleaching), amellyel az asszociációban részt vevő fehérjék hányada meghatározható. A módszer alapja az, hogy fotolabilis akceptor és fotostabil donor közötti FRET kölcsönhatás esetében a donor gerjesztése az akceptor kiégetéséhez vezet. Mivel a donorral FRET kölcsönhatásban nem levő, tehát tőle messze található akceptor molekulák nem égnek ki, a

donorral kölcsönható akceptor aránya meghatározható. Az expressziós szintek ismeretében a heteroklaszterben levő molekulák átlagos sztöchiometriája is meghatározható. A módszer segítségével vizsgáltuk az ErbB1 és ErbB2 receptorokat nyugvó és EGF-fel stimulált SKBR-3 sejteken. Megállapítottuk, hogy a receptorok már a stimuláció előtt is alkotnak heteroasszociátumokat, és az ErbB2 ErbB1-gyel heteroasszociáló hányada jelentősen megnő EGF stimulációt követően (10%-ról 21%-ra). A heteroklaszterben levő ErbB1-ErbB2 arány 1:1,5 volt stimulálatlan sejtekben, és ezt az EGF kezelés 1:4-re növelte. Ezen vizsgálatok megerősítették korábbi eredményeinket, ill. kvantitatív jellegük folytán hozzájárulnak az asszociációk jobb megértéséhez [4].

5. „Number and brightness” mérések szerint az ErbB1 és ErbB2 eltérő klaszterizációs tulajdonságokat mutat

Adaptáltuk a nemrég leírt „number and brightness” (N&B) módszert az ErbB1 és ErbB2 fehérjék homoklasztereinek tanulmányozására. A módszer által szolgáltatott legfontosabb paraméter a molekuláris klaszterek „fényessége”, ami a klaszterben levő molekulák számával arányos. Először az ErbB1 homoklasztereit vizsgáltuk ErbB1-eGFP-t különböző szinten kifejező stimulálatlan és EGF-fel kezelt sejteken. Megállapítottuk, hogy az ErbB1 receptor csak magas expresszió esetén alkot molekuláris dimereket stimulálatlan sejtekben, azonban EGF hatására csaknem teljes mértékben dimerizálódik. EGF kezelést követően azonban nemcsak dimerek, hanem átlagosan 5-6 ErbB1 receptort tartalmazó klaszterek is megjelennek, melyek kolokalizálnak a klatrin burkú gödrökkel. Ezzel ellentétben az ErbB2 már nyugvó sejtekben is homoklasztereket alkot, amit ErbB2-mYFP-t kifejező sejteken vizsgáltunk. Az ErbB2 molekuláris szintű homoklaszterei mellett azonosítottunk olyan klasztereket is, melyek mérete a több száz nanométert is elérte. Ezen mikroszkopikus klaszterek részleges kolokalizációt mutattak a kaveolákkal. EGF kezelést követően az ErbB2 molekuláris homoklasztereinek mérete jelentősen csökkent, de ez a változás csak a mikroszkopikus klaszterekben volt kimutatható (4. ábra). Előállítottunk egy olyan ErbB2 variánst, amelyből a PDZ domén kötő régiót deletáltuk. Mivel ezen ErbB2 variáns asszociációs tulajdonságai a vad típuséhoz hasonlóak voltak, a PDZ domén kötő régió nem játszik jelentős szerepet az ErbB2 nagy homoasszociációs készségében [5].

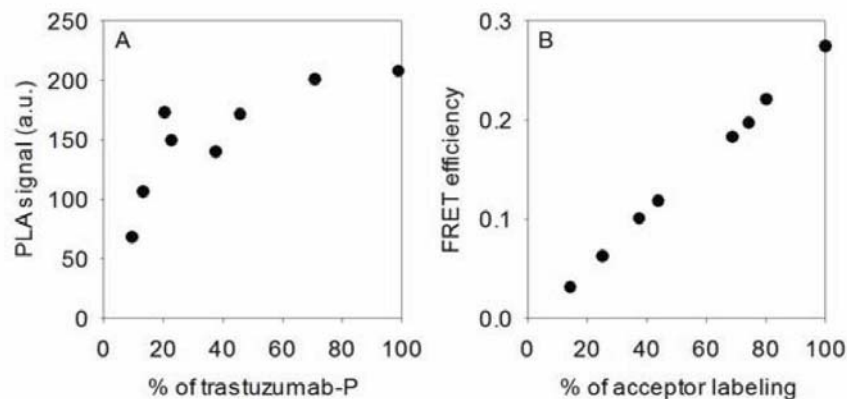


4. ábra. Az ErbB2-mYFP homoklaszterizációs tulajdonságai nyugalomban levő és EGF stimulált sejteken.

Szérum éheztetett (A) és 100 nM EGF-fel stimulált (B) sejtek fényesség-átlag intenzitás pontgrafikonja látható az ábrán. A fényesség értékeket külön-külön értékeltük ki a mikroszkopikus klasztereken belül (szaggatott vonal) és kívül (folytonos vonal) kezeletlen (fekete) és EGF kezelt (piros vonal) sejteken (C).

6. A proximitás ligációs vizsgálat nem alkalmas a receptor klaszterizáció kvantitatív mérésére

A fehérjeasszociációk mérésére általunk korábban alkalmazott módszerek (pl. FRET, N&B) nem vagy nehézkesen alkalmazhatóak szövetmetszeteken a rossz jel/zaj arány miatt. A nemrégiben kifejlesztett PLA (proximity ligation assay) módszer viszont használható szövetmetszeteken is, azonban kvantitatív jellegét még nem vizsgálták. Ezért a PLA módszert a fehérje klaszterek kvantitatív vizsgálatára már régen alkalmazott FRET-tel vetettük össze. Főbb megállapításaink a következők voltak: a. Mind molekuláris asszociációk, mind intramolekuláris távolságok mérése esetén a FRET szignál az expressziós szinttől a várható lineáris összefüggést mutatta, míg a PLA esetében telítési effektust vettünk észre (5. ábra). b. A telítési effektus részben a PLA reakcióban részt vevő polimeráz enzim használatával magyarázható. c. Jelentős mértékű eltérést találtunk a PLA és a FRET mérések eredményei között, amikor különböző mintákon (pl. kontroll és növekedési faktor stimulált) hasonlítottuk össze a vizsgált receptorok (pl. ErbB1) asszociációit. Le kellett vonnunk azt a következtetést, hogy bár a PLA módszer az irodalomban igen érzékeny eljárásként kezd közismertté válni, kvantitatív mérések végzésére nem alkalmas, és az eredmények interpretációja csak igen gondosan megtervezett és kivitelezett kontroll kísérletek után lehetséges [6].



5. ábra. Telítési effektus a PLA-ban az antitest denzitás függvényében.

A. SKBR-3 sejteken az ErbB2 két epitópjá közötti proximitást mértük PLA segítségével. Az egyik epitóphoz kötődő oligonukleotiddal jelölt antitestet (pertuzumab) telítési koncentrációban adtuk, míg a másik epitóphoz kötődő, oligonukleotiddal jelölt antitestet (trastuzumab-priming, trastuzumab-P) különböző arányban kevertük jelöletlen trastuzumabbal. A PLA jel erősségét a trastuzumab-priming antitest denzitása függvényében ábrázoltuk. B. Ugyanazon két epitóp közötti proximitást becsültük meg FRET segítségével. A donorral jelölt antitestet (AlexaFluor488-pertuzumab) telítő koncentrációban adtuk, míg az akceptorral jelölt antitestet (AlexaFluor546-trastuzumab) jelöletlen trastuzumabbal kevertük, és ábrázoltuk a FRET hatásfokot az akceptor denzitás függvényében.

Uzsoki utcai Kórház

1. Minták feldolgozása és transzportja a Debreceni Egyetemre

A Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézete számára készítettünk szövetmetszeteket ErbB2-t fokozottan expresszáló emlőtumoros mintákból és a mintákat szárazjégen elszállították Debrecenbe, ahol a mintákat további feldolgozásnak vetették alá. Ezen beteganyag klinikai feldolgozását elvégeztük és szintén a debreceni kooperáló munkacsoport rendelkezésére bocsátottuk. Azonban a trastuzumab kezelés hatásosságára vonatkozóan ezen adatokból nem várható statisztikailag értékelhető információ, mert a

betegek töredéke kapott csak trastuzumab kezelést. Az OTKA pályázat utolsó két évében tovább gyűjtöttük a szövet- és a hozzájuk tartozó szérummintákat, és elkezdjük az utánkövetési adatok gyűjtését is, amelyek az idő rövidege miatt csak korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre.

2. A sebészeti mintavétel folytatása

Már az OTKA pályázat indulása előtt is végeztünk mintagyűjtést tumor miatt operált betegekből, de a jelen pályázat alatt tökéletesítettük a mintavétel technikáját és logisztikáját. A transzportlánc hatékonyabbá tétele során a mintavételt a patológus végzi, ezáltal maradéktalanul teljesül az az elv, hogy a tudományos célú mintavétel nem befolyásolja a rutin diagnosztikát. A minták életképessége, felhasználhatósága ezáltal tovább javult. Az utóbbi időben vett szövetminták mellé vérminta levétele és tárolása is megtörténik.

3. Betegdokumentáció, informatikai rendszer

A klinikai adatok tárolására és a betegek követésére korábban általunk kifejlesztett MS Access alapú informatikai rendszert tökéletesítettük, funkcióit bővítettük. A rendszer emlődaganatok szempontjából fontos új prognosztikai faktorokkal történő kiegészítése megtörtént. A beteg klinikai adatainak rendszerbe történő bevitele kb. 3-4 héttel a mintavétel után történik, ugyanis ekkora realizálódik biztosan a szövettani lelet, valamint a perioperatív szövődmény megléte vagy hiánya is. Az adatbázis a beteg személyes adatait, előzményadatait, a mintavétel körülményeit, a minta számát és egyéb jellemzőit, az eltávolított daganatos szövet patológiai tulajdonságait, a szövetminta nyerése közben végzett műtét klinikai adatait és követési adatokat tartalmaz. A beteg személyes azonosítására szolgáló adatok és a klinikai adatok szétválasztását a rendszer képes megvalósítani.

4. Betegek követése

A mintavételen átesett betegeink követését folyamatosan végeztük. A követés egy speciális ambuláns rendelés formájában történik, a klinikai adatokat az általunk kifejlesztett informatikai rendszeren rögzítjük. A betegkövetést szervezett, OEP által nem finanszírozott ambulancia keretében valósítjuk meg a kórház egyik rendelőjét használva. A követés adatait a saját informatikai rendszerünkben rögzítjük, melyek szintén titkosítva kerülnek a rendszerbe, a betegadatoktól elkülönülten.

Az OTKA pályázat feltüntetésével született, a beszámolóban tárgyalt cikkek:

1. Váradi T, Mersich T, Auvinen P et al. Binding of Trastuzumab to ErbB2 Is Inhibited by a High Pericellular Density of Hyaluronan, *J Histochem Cytochem* 2012;60:567-575.
2. Váradi T, Roszik J, Lisboa D et al. ErbB protein modifications are secondary to severe cell membrane alterations induced by elisidepsin treatment, *Eur J Pharmacol* 2011;667:91-99.
3. Kovács T, Kárász A, Szöllősi J et al. The density of GM1-enriched lipid rafts correlates inversely with the efficiency of transfection mediated by cationic liposomes, *Cytometry A* 2009;75:650-657.
4. Szabó A, Szöllősi J, Nagy P. Coclustering of ErbB1 and ErbB2 revealed by FRET-sensitized acceptor bleaching, *Biophys J* 2010;99:105-114.

5. Nagy P, Claus J, Jovin TM et al. Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using number and brightness analysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16524-16529.
6. Mocanu MM, Váradi T, Szöllősi J et al. Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA), *Proteomics* 2011;11:2063-2070.