

## ZÁRÓJELENTÉS

A pályázata címe: ErbB receptorok szerepe epitél eredetű tumorokban: receptor tirozinkinázok, mint a tumor ellenes terápiák lehetséges target molekulái.

A pályázat száma: 43061

Témavezető: Szöllősi János

### Összefoglalás

Az erbB2-erbB2 és erbB2-erbB1 molekulák homo- és heteroasszociációja – akár csak más erbB hetero-oligomereké – fontos szerepet játszhatnak a jelátvitelben így az immunoterápiában is. Kísérleteket végeztünk annak felderítésére, hogyan modulálja ezt a folyamatot más kölcsönható molekulák, pl. integrinek, CD44 (hialuronsav receptor) sejtfelszíni jelenléte. Az ErbB2 ellenes immunterápia (trastuzumab kezelés) során kialakuló trastuzumab rezisztencia lehetséges okait is vizsgáltuk. FRET eredményeink alapján elkészítettük ErbB2 dimer molekuláris modelljét. A trastuzumab rezisztens JIMT-1 ill. MKN-7 valamint a szenzitív SKBR-3 és N87 tumor sejtvonalakon végzett összehasonlító kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a trastuzumab kezelés korai elkezdésével még a rezisztens sejtek esetén is részleges válasz érhető el. A xenograft kísérletek rámutattak arra, hogy az antitest által közvetített citotoxicitás (ADCC) a trastuzumab kezelés kedvező hatásának elsődleges oka. A geldanamycin ill. 17AAG sejtosztódást gátló hatása hatékonyabbnak bizonyult trastuzumab rezisztens sejtekben. Ugyanakkor a CD44 leszabályozása, valamint a hialuronsav szintézis gátlása növelte a trastuzumab kezelés hatékonyságát. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy célzott adjuváns kezelés nagymértékben fokozhatják a trastuzumab terápia hatékonyságát.

### Summary

Homo- and heteroassociations of erbB2-erbB2 and erbB2-erbB1 molecules – similarly to that of other ErbB hetero-oligomers – play an important role in signal transduction and immunotherapy. Our experiments aimed to reveal whether the cell

surface presence of interacting molecules such as integrin and CD44 (receptor for hyaluronic acid) molecules can modulate these processes. We have also studied the possible causes of trastuzumab resistance developing during the ErbB2 targeted immunotherapy. We have prepared a useful molecular model of ErbB2 dimer on the basis of our FRET results. By comparing the behavior of trastuzumab resistant (JIMT-1 and MKN-7) and sensitive (SKBR-3 and N87) tumor cell lines we found that early trastuzumab treatment can be partially beneficial even in resistant cell lines. It was also revealed that the primary reason of the efficacy of trastuzumab treatment in xenograft models is the antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC). The treatment using geldanamycin or its derivative 17AAG was more efficient in trastuzumab resistant cells than in sensitive cells. Downregulation of CD44 and inhibition of synthesis of hyaluronic acid increased the efficiency of the trastuzumab treatment. These results suggest that targeted adjuvant therapy can significantly enhance the efficacy of the trastuzumab therapy.

### Beszámoló

Az erbB2-erbB2 és erbB2-erbB1 molekulák homo- és heteroasszociációja – akár csak más erbB hetero-oligomereké – fontos szerepet játszhatnak a jelátvitelben így az immunoterápiában is. Elképzelhető, hogy a folyamat más kölcsönható molekulákkal, pl. integrinokkal, CD44-el is modulálható. A különböző kölcsönhatások előfordulását képes befolyásolni az egyes molekuláris szereplők expressziós szintje, és sejtfelszíni kompartmentalizációra. Az interakciók végső soron szerepet játszanak az ErbB ellenes immunterápia (pl. trastuzumab, vagy Omnitarg) hatékonyságában, ill. adjuvánsok általi modulálhatóságában. Kísérleteink a molekuláris szintű kölcsönhatások szereplőinek és sejtfelszíni kompartmentalizációjának azonosítására, a kölcsönhatások meglétének és modulálhatóságának kimutatására irányultak.

A trastuzumab rezisztens JIMT-1 ill. MKN-7 valamint a szenzitív SKBR-3 és N87 tumor sejtvonalak esetében összehasonlító kísérleteket végeztünk az erbB2 molekulák, integrinok és lipid tartalom expressziós szintjeinek, kolokalizációs és asszociációs mintázatainak felderítésére. A fenti paramétereknek a specifikus antitestek,

az epidermális növekedési faktor (EGF), a Heregulin és a citokalazin-D hatására bekövetkező változásait szintén tanulmányoztuk. A kolokalizáció mértékét úgy határoztuk meg, hogy a sejtek konfokális képeiből mindhárom spektrális csatornában (három különböző molekula jelölése) felvett kép-párra kiszámoltuk a kereszt korrelációs koefficiensst. Ehhez felhasználóbarát célprogramot fejlesztettünk ki, mely LabView környezetben fut. A molekuláris távolságokat áramlási citometriás és képalkotó FRET mérésekkel határoztuk meg.

Az áramlási citometriás mérések alapján a trastuzumab rezisztens sejtvonalak a  $\beta$ 1-integrinre magasabb expressziós szintet mutattak a szenzitívekhez képest. Mind a négy sejtvonal esetében  $\beta$ 1-integrin, erbB2 és lipid tutaj kolokalizációt figyeltünk meg. A 4D5, EGF és Heregulin kezelés csekély mértékben csökkentette az erbB2 és  $\beta$ 1-integrin kolokalizációját. A lipid tutajok keresztükötése jelentős mértékben csökkentette az erbB2 molekulákkal és integrinokkal történő kolokalizációjukat minden sejtvonal esetében, de nem volt hatással a  $\beta$ 1-integrin és erbB2 kolokalizációjára.  $\beta$ 1-integrin keresztükötése csökkentette ezen receptor erbB2-vel és lipid tutajokkal történő kolokalizációját, de nem befolyásolta az erbB2-lipid tutaj kolokalizációt. A  $\beta$ 1-integrin, erbB2 és lipid tutajok között megvalósuló hármas kolokalizáció mind a négy sejtvonal esetén megmaradt citokalazin-D kezelést követően, így az citoskeleton-függetlennek tűnik, és feltehetőleg csak a membrán receptorok és a lipid tutajok kapcsolatától függ. A sejtfelszíni receptormolekulák lipid tutajok által befolyásolt heterogén eloszlását a sejtmembránban nemcsak az ErbB2 molekulák esetén tudtuk kimutatni hanem az IL-2 és IL-15 receptorok esetén is. Megállapítottuk, hogy a lipid tutajok jelenléte nagyban hozzájárul a sejtmembrán szerkezetének heterogeneitásához ill. a sejtfelszíni receptorok asszociációjához, szupramolekuláris szerveződéséhez.

A molekuláris asszociációk kimutatására fluoreszcencia energia transzfer (FRET) módszert alkalmaztunk. A FRET határfokának meghatározására új komputerprogramot dolgoztunk ki. A program felhasználóbarát és elősegíti nagyszámú minta gyors kiértékelését. Új eljárást dolgoztunk ki a FRET mérések során használatos donor-akceptor festék-párok optimális kiválasztására. Rámutattunk, hogy milyen kritériumok alapján dönthetjük el, hogy egyes áramlási citométernél milyen festék-párokat alkalmazzunk. Intracelluláris molekuláris asszociációk vizsgálatára a zöld fluoreszcens

fehérje (GFP) különböző változatait kívánjuk a jövőben felhasználni. Ennek érdekében kalibrálási eljárást dolgoztunk ki a “cyan” és a „yellow” fluoreszcens fehérje-pár esetére, melynek segítségével a FRET méréseket kvantitatívvá tudjuk tenni.

Az EGF receptort magas szinten kifejező A431 sejteket transzfektáltunk ErbB2-mYFP-vel, és az így létrehozott sejtvonalat (A4-ErbB2-mYFP). Ha EGF-el konjugált mágneses göngyökkal stimuláltunk az EGF receptorokat, az ugyanakkor transzaktiválta az ErbB2-mYFP receptorokat. Az A4-ErbB2-mYFP sejtvonal tulajdonságait összehasonlítottuk a Herceptin szenzitív SKBR-3 és a Herceptin rezisztens JIMT-1 sejtekkel. Ha Herceptinnel kezeltük a sejteket az ErbB2 foszforilálódott az A4-ErbB2-mYFP és az SKBR-3 sejteken de nem foszforilálódott a JIMT-1 sejteken. Ha a sejteket Herceptinnel konjugált mágneses gyöngyökkal stimuláltuk, mind a három sejtvonal esetén foszforilálódtak az ErbB2 receptorok, bár csak a gyöngyök közvetlen közelében.

Az ErbB2 receptor szerkezetének megértéséhez elkészítettük az ErbB2 dimer molekuláris modelljét, amelynél az ErbB2 molekula közel teljes hosszát figyelembe vettük. Az extracelluláris domén valamint az intracelluláris kináz domén röntgenkristallográfiás adatait, a transzmembrán domén NMR vizsgálatokkal nyert adatait használtuk fel e molekuláris modellezésünknel. Az extracelluláris domén membrántól való távolságát fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekkel határoztuk meg, hasonlóképpen a dimerekben az extracelluláris domének egymástól távolságára is az epitópok között mért FRET adatok alapján következtettünk. A modell alapján dimerizációs kölcsönhatásokat jósoltunk az extracelluláris doménnél, a transzmembrán doménnél, valamint az intracelluláris kináz doménnél is.

Az ErbB2 család tagjain kívül a PDGF tirozinkináz receptor jelátviteli folyamatait is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a PDGF stimuláció során kiváltott intracelluláris kalcium válasz hossza a sejtek konfluenciájától függ. A sejt-sejt kontaktussal rendelkező sejtek rendszerint hosszú (több mint 500 sec hosszúságú) kalcium választ adnak PDGF hatására, az egyedül álló sejtek, pedig csak kb. 200 sec hosszúságú választ adnak. Kimutattuk, hogy a kalcium válasz hossza, független attól, hogy a sejtek a sejtciklus melyik fázisában vannak.

Geldanamycin és származéka a 17-AAG képes leszabályozni a hősokk fehérje Hsp90 kliens fehérjéit, köztük az ErbB2-t is. Kísérleteink során összehasonlítottuk a a

17AAG ErbB2-t leszabályozó képességét trastuzumab rezisztens JIMT-1 és szenzitív SKBR-3 emlőtumor sejteken. Ugyanakkor vizsgáltuk, hogy a 17AAG és az trastuzumab elősegítik-e egymás hatását. Az alapszintű aktiváltsági fok, az aktiválásra adott válasz mértéke, valamint a trastuzumab ErbB2-t leszabályozó képessége jóval alacsonyabb volt a rezisztens sejtvonalnál. A 17-AAG 5-10 perces kezelése növelte az ErbB2 homodimerizációját mindkét sejtvonalnál és csökkentette a sejtek proliferációját, az SKBR-3 sejtvonalnál az IC<sub>50</sub> = 70 nM, a JIMT-1 sejtvonalnál IC<sub>50</sub> = 10 nM. Ezek szerint a trastuzumabra rezisztens JIMT-1 érzékenyebben reagált a 17AAG-ra és ez felveti annak a lehetőségét, hogy a 17AAG-ból terápiás gyógyszert fejlesszenek ki. A 17AAG antiproliferációs hatása pozitív korrelációt mutatott az ErbB2 foszforiláltságával és leszabályozódásával, és elsősorban apoptózis révén valósult meg és bár magasabb koncentrációnál nekrozis is megfigyelhető volt.

A klinikumban széleskörben használt anti-ErbB2 humanizált antitest, a trastuzumab biológiai hatásának, valamint az ellene fellépő rezisztencia kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert. Kísérleteink során egér xenograft modellt készítettünk, SCID egereket oltottunk be JIMT-1 sejtekkel, amelyek ErbB2 pozitivitást mutattak de trastuzumabra rezisztensnek bizonyultak. Vizsgáltuk az antitest által közvetített citotoxicitás (ADCC), és meglepődve tapasztaltuk, hogy a trastuzumab kezelés a trastuzumabra egyébként rezisztens JIMT-1 sejtek beoltásával létrehozott szubmakroszkópikus xenograftok esetén is képes volt a tumor növekedését gátolni 5-7 hétig. A megfigyelt jelenséget valószínűleg az ADCC okozhatta, hiszen a trastuzumab-(Fab)<sub>2</sub> hatástalan volt. Ugyanakkor az „*in vitro*” ADCC egyformán hatásos volt trastuzumabra rezisztens ill. szenzitív sejtvonalak ellen. Mindezek az eredmények azt sugallják, hogy az ADCC elsődleges szerepet játszhat a trastuzumab szubmakroszkópikus tumorokon gyakorolt hatásában.

A trastuzumab kezelés ellen eleve meglévő, vagy a kezelés során kialakuló rezisztencia egyik lehetséges oka, hogy a sejtfelszíni glikokalix (pl. mucin) maszkírozza a trastuzumab kötőhelyét. Jelen kísérleteink során a hialuronsav és receptorának a CD44-nek az szerepét vizsgálta trastuzumab rezisztencia kialakulásában. Kimutattuk, hogy a CD44 magas szintű expressziója korrelációt mutatott a trastuzumab gyors internalizációjával, és hogy az siRNS által kiváltott CD44 expressziós szintjének

leszabályozódása csökkentette a trastuzumab internalizációját és a sejtek proliferációját. A hialuronsav szintézist gátló 4-metilumbelliferon (4-MU) jelentősen csökkentette a hialuronsav szintézisét JIMT-1 xenograftokban, növelte a trastuzumab internalizációjának sebességét, és csökkentette a sejtek osztódását. A 4-MU kezelés jelentősen elősegítette a trastuzumab sejtosztódást gátló hatását még a rezisztens JIMT-1 xenograftokban is. Eredményeink arra utalnak, hogy a CD44-hialuronsav útvonal fontos szerepet játszhat tumor sejtek konvencionális a receptor-irányított terápiákkal szemben kialakított menekülési lehetőségeiben.

Megjelent és elküldött cikkek:

1. Vereb, G., **Szöllősi, J.**, Nagy, P., Matkó, J., Mátyus L., Damjanovich, S.: Dynamic, yet structured. The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003. 100, 8053-8058. **IF: 10.452**
2. Szentesi, G., Horváth, G., Bori, I., Vámosi, G., **Szöllősi, J.**, Gáspár, R., Damjanovich, S., Jenei, A., Mátyus, L.: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. Comput. Methods Programs Biomed. 2004. 75:201-211. **IF: 0.686**
3. Vereb, G., Matkó, J., **Szöllősi, J.**: Cytometry of fluorescence resonance energy transfer. Methods Cell Biol. 2004. 75:105-152. **IF: 1.392**
4. Matkó, J., **Szöllősi, J.**: Regulatory aspects of membrane microdomain (raft) dynamics in live cells. A biophysical approach. In: Membrane Microdomain Signaling: Lipid Rafts in Biology and Medicine. (Ed: Mattson, M. P.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004. pp. 15-46.
5. Vereb, G., **Szöllősi, J.**, Damjanovich, S., Matkó, J.: Exploring membrane microdomains and functional protein clustering in live cells with flow and image cytometric methods.

In: Reviews in Fluorescence (Eds: Geddes C. D. and Lakowicz J. R) Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2004. pp. 99-120.

6. Vámosi, G, Bodnár, A., Vereb, G., Jenei, A., Goldman, C. K., Langowski, J., Tóth, K., Mátyus, L., **Szöllősi, J.**, Waldmann, T. A., Damjanovich, S.: IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. 101:11082-11087. **IF: 10.452**

7. Bagossi, P., Horváth, G., Vereb, G., **Szöllősi, J.**, Tózsér, J.: Molecular modeling of nearly full-length ErbB2 receptor. Biophys. J., 2005. 88: 1354-1363. **IF: 4.585**

8. Diermeier, S., Horváth, G., Knuechel-Clarke, R., Hofstaedter, F., **Szöllősi, J.**, Brockhoff, G.: Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2-neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. Exp. Cell Res., 2005. 304:604-619. **IF: 4.007**

9. Horváth, G., Petrás, M., Szentesi, G., Fábrián, F., Park, J. W., Vereb, G., **Szöllősi, J.**: Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. Cytometry, 2005. 65A:148-157. **IF: 2.698**

10. Bene, L., **Szöllősi, J.**, Szentesi, G., Damjanovich, L., Gáspár, R. Jr., Waldmann, T. A., Damjanovich, S.: Detection of receptor trimers on the cell surface by flow cytometric fluorescence energy homotransfer measurements. Biochim. Biophys. Acta. 2005. 1744:176-198. **IF: 3.441**

11. Mocanu, M., Fazekas, Z., Petrás, M., Nagy, P., Sebestyén, Z., Isola, J., Tímár, J., Park, J. W., Vereb, G., **Szöllősi, J.**: Associations of ErbB2,  $\beta$ 1-integrin and lipid rafts on Herceptin<sup>®</sup> (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. Cancer Letters, 2005. 227:201-212. **IF: 2.938**

12. Nagy, P., Bene, L., Hyun, W. C., Vereb, G., Braun, M., Antz, C., Damjanovich, S.,

Paysan, J., Park, J. W., **Szöllősi, J.**: Novel calibration method for flow cytometric fluorescence resonance energy transfer measurements between visible fluorescent proteins. *Cytometry*, 2005. 67A:86-96. **IF: 2.698**

13. Friedländer, E., Arndt-Jovin, D., Nagy, P. Jovin, T. M., **Szöllősi, J.**, Vereb, G.: Signal transduction of erbB receptors in trastuzumab (Herceptin) sensitive and resistant cell lines: local stimulation using magnetic microspheres as assessed by quantitative digital microscopy. *Cytometry*, 2005. 67A:161-171. **IF: 2.698**

14. Vereb, G., Feuerstein, B.G., Hyun, W. C., Fulwyler, M. J., Balázs, M., **Szöllősi, J.**: Biphasic calcium response of platelet-derived growth factor stimulated glioblastoma cells is a function of cell confluence, but not of cell cycle. *Cytometry*, 2005. 67A:172-179. **IF: 2.698**

15. Zsebik, B., Citri, A., Isola, J., Yarden, Y., **Szöllősi, J.**, Vereb, G.: Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunol Lett.*, 2006. 104, 146-155. **IF: 2.136**

16. Mátyus, L., **Szöllősi, J.**, Jenei, A.: Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2006. 83, 223-236. **IF: 1.841**

17. Szegedi, I., Kiss, C., Karaszi, E., Vámosi, G., **Szöllősi, J.**, Kovács P, Benkő, I.: Differential regulation of umbilical cord blood and leukemic B cells by Interferon-Alpha (IFN-alpha): Observations in cultured cells. *Pathol. Oncol. Res.*, 2006. 12, 159-163. **IF: 1.162**

18. Vámosi, G., Bodnár, A., Vereb, G., **Szöllősi, J.**, Damjanovich, S.: Role of lipid microdomains in the formation of supramolecular protein complexes and transmembrane signaling. In: *Lipid Rafts and Caveole*, (ed: Fielding, C. J.), Wiley - VCH, Weinheim, 2006. pp. 141-174.



19. Vámosi, G., Vereb, G., Bodnár, A., Tóth, K., Baudendistel, N., Damjanovich, S., **Szöllősi, J.:** Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). In: Zellulare Diagnostik, Grundlagen, Methoden and klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, (eds: Sack, U., Tarnok, A., Rothe, G.) Karger, Basel, 2006. pp. 120-138.
20. **Szöllősi, J.,** Damjanovich, S., Nagy, P., Vereb, G., Mátyus, L.: Principles of resonance energy transfer. In: Current Protocols in Cytometry, (ed: Robinson, P.) John Wiley and Sons, New York, 2006. pp. 1.12.1-1.12.16.
21. Nagy, P., Vereb, G., Damjanovich, S., Mátyus, L., **Szöllősi, J.:** Measuring FRET in flow and image cytometry. In: Current Protocols in Cytometry, (ed: Robinson, P.) John Wiley and Sons, New York, 2006. pp. 12.8.1-12.8.11.
22. Barok, M., Isola, J., Pályi-Krekk, Z., Nagy, P., Juhász, I., Vereb, G., Päivikki Kauraniemi, P., Kapanen, K., Minna Tanner<sup>4</sup>, M., Vereb, G., **Szöllősi, J.:** Trastuzumab causes ADCC-mediated growth-inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Molec. Cancer Therapy*, 2007. submitted
23. Pályi-Krekk, Z., Barok, M., Isola, J., Tammi, M., **Szöllősi, J.,** Nagy, P.: Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalization in trastuzumab resistant breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2007. submitted