



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Single cell biochemistry to visualize antigen presentation and drug resistance

Griekspoor, A.C.

Citation

Griekspoor, A. C. (2006, November 1). *Single cell biochemistry to visualize antigen presentation and drug resistance*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4962>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4962>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Epilogue

Nederlandse Samenvatting

Epilogue

Single Cell Biochemistry

The studies described in this thesis illustrate how advanced microscopic techniques can give new insights in cellular processes like antigen presentation and drug resistance. Many of the findings presented here have thus far gone unnoticed simply due to lack of temporal and/or spatial resolution of previously used methodologies. For example, from previous *in vitro* experiments using isolated peptidase species it was thought that intracellular peptides had a half-life in the order of minutes. Now, for the first time, we could study the collective peptidase activity at once, and even more important, in its native environment, a living cell. Our work shows that peptidases work far more efficient than previously assumed, reducing the half-life of a peptide to seconds rather than minutes or hours. This has important consequences for a process like antigen presentation as outlined in **Chapter 3**.

Another example is given in **Chapter 5** where we show that multi-vesicular and multi-laminar lysosomal structures called MIIC class II containing Compartments (MIICs) consist of two distinct domains, the limiting membrane and the internal structures. These domains are different in terms of protein and lipid composition, and form distinct microenvironments for protein-protein interaction. Again, these microenvironments within the MIIC had previously gone unnoticed, simply because the size of the total organelle is smaller than the wavelength of visible light, and intra-organelle differences can thus not be studied using conventional microscopy. Only when examined at higher resolution

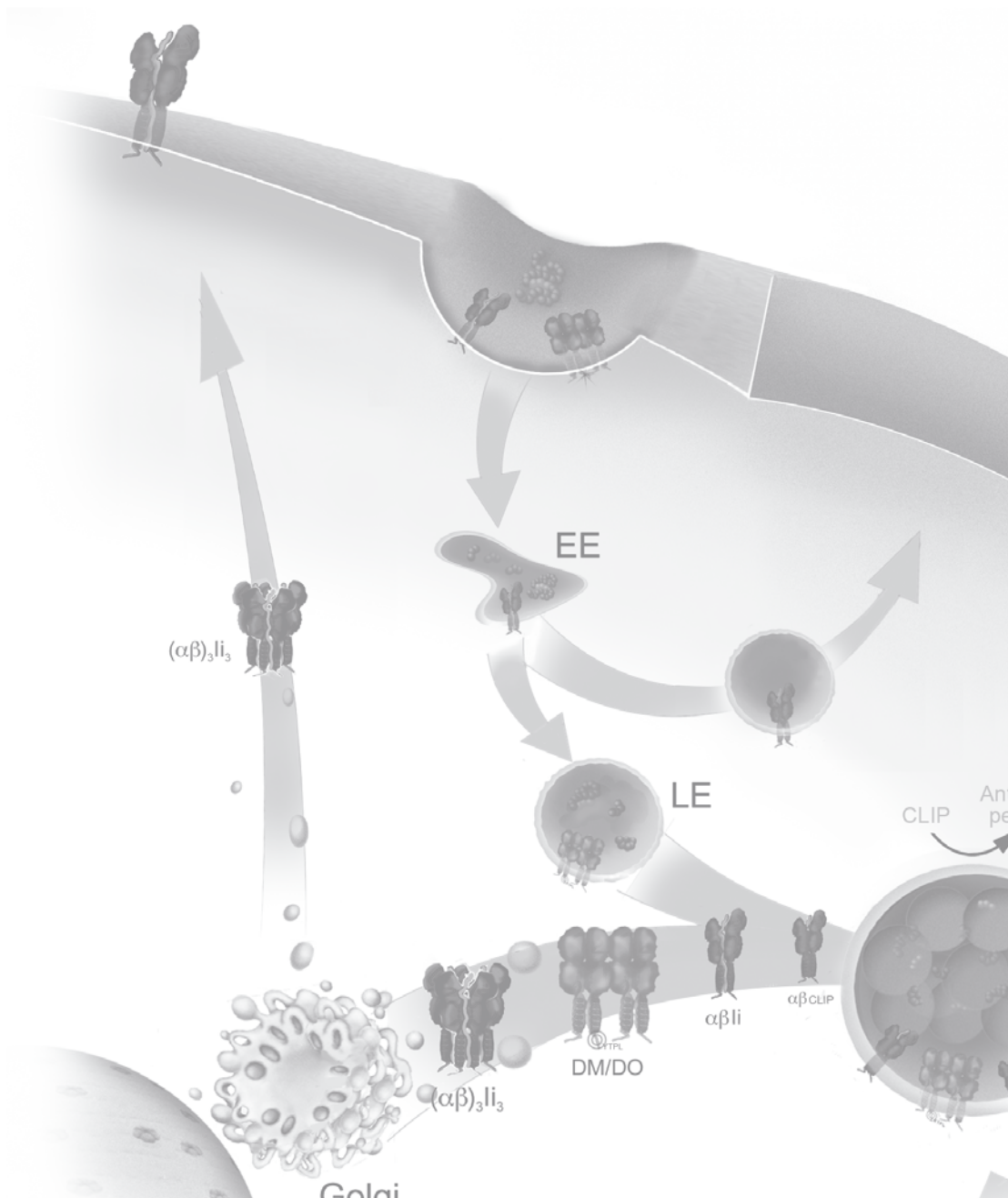
using FRET microscopy, we were able to reveal their existence.

A final example is taken from **Chapter 11** in which we used the same FRET microscopy technique to show that the complexity of events that precede gene transcription goes much further than a binary system of protein-protein interaction versus no interaction. Our results demonstrate the importance of protein orientation as means of regulation, an aspect that we show is highly relevant in tamoxifen resistance of breast cancers.

Recent technological developments have taken us further and deeper into living cells, and revealed unknown levels of dynamics and complexity of processes that have already been studied extensively. This trend is only set to continue as new techniques and probes become available. The latest additions to the cell biologist's toolbox include nanoprobe, and genetically encoded probes with higher quantum yield, wider range of available spectra, and photo-activation and conversion properties. New microscopic techniques like FRET, 4Pi and STED microscopy improve the resolution with which cellular processes can be studied even beyond the diffraction limit of normal light microscopy, and rapidly evolve into tools that can be used also by non-biophysicists. Although this obviously requires precaution, these developments harbor great promise for the future of cell biology and the detailed understanding of processes at the basis of our immune response and resistance to anti-cancer drugs.

Nederlandse Samenvatting

Summary in Dutch



Nederlandse Samenvatting

De biochemie van een enkele cel

De cel is de bouwsteen van het leven, de structurele en functionele eenheid waaruit alle levende organismen zijn opgebouwd. De complexe processen die plaatsvinden in de cel worden veelal bestudeerd met biochemische technieken. Hierbij worden grote aantallen cellen opengemaakt en de vrijkomende eiwitten *en masse* bestudeerd. Ook al levert dat vaak zeer waardevolle informatie op, bij deze technieken ontbreekt de tijdsresolutie voor het bestuderen van zeer dynamische processen. Daarnaast, zal de analyse van miljoenen cellen tegelijkertijd automatisch betekenen dat men naar de gemiddelde respons van alle cellen kijkt. Hierdoor gaat inzicht in cel tot cel variatie en dynamisch bereik verloren. Tot slot is het bijna onmogelijk om te bestuderen waar in de cel een proces plaatsvindt.

Met de ontwikkeling van microscopische technieken in combinatie met de ontdekking van fluorescente eiwitten kunnen veel van de hierboven beschreven beperkingen worden overwonnen. Zeer dynamische

Zeer dynamische reacties kunnen nu relatief gemakkelijk in detail worden bekeken en in de context van een enkele cel, vandaar de term *biochemie van een enkele cel*.

reacties kunnen nu relatief gemakkelijk in detail worden bekeken en in de context van een enkele cel, vandaar de term “biochemie van een enkele cel”. Op deze manier hebben we twee verschillende cellulaire

processen bestudeerd, antigeen presentatie en drug resistentie, op een tot nu toe ongekend niveau. Beide projecten lijken op het eerste gezicht niet veel met elkaar van doen te hebben, maar zijn echter gekoppeld door gebruik van dezelfde technieken. Het bestuderen van individuele cellen met behulp van gevoelige microscopische technieken heeft tot belangrijke verbeteringen geleid van ons begrip over beide onderwerpen.

Antigeen presentatie

Antigeen presentatie vormt het fundament waarop het adaptieve immuunsysteem is gebouwd. In de mens zijn er drie verschillende eiwitten die de presentatie van antigenen op het celoppervlak verzorgen. Elk van deze eiwitten maakt deel uit van een aparte antigeen presentatie route bestaande uit verschillende stappen van antigeen formatie en belading. Waar het CD1 molecuul lipiden presenteert van zowel endogene als exogene origine, presenteren de zogenaamde MHC klasse I en II moleculen voornamelijk peptiden (een overzicht vindt men in **Hoofdstuk 1**). De MHC klasse II route is alleen operationeel in professionele antigeen presenterende cellen en door de cel opgenomen materiaal vormt de bron van antigenen die door deze route worden gepresenteerd. Dit in tegenstelling tot de MHC klasse I route welke functioneel is in alle cellen met een kern en steekproefsgewijs het intracellulaire peptide repertoire continu in de gaten houdt (overzicht in **Hoofdstuk 2**). In het eerste werk dat hier wordt beschreven hebben wij dit proces van peptide steekproeven bestudeerd, een proces dat is ontstaan als zijsprong van eiwit afbraak.

Summary in Dutch

Het overgrote deel van peptide wordt gegenereerd door het proteasoom, een groot eiwitcomplex dat eiwitten verwerkt die zijn gemarkeerd voor afbraak. Deze zullen uiteindelijk worden gerecycled tot losse aminozuren door de cellulaire peptidases, zodat ze in nieuwe eiwitten kunnen worden hergebruikt. Sommige peptiden weten afbraak echter te ontlopen door transport in het endoplasmatisch reticulum met behulp van de Transporter geassocieerd met Antigeen Presentatie (TAP) en binding aan MHC klasse I moleculen. Deze balans tussen peptide afbraak en presentatie is cruciaal voor een goede MHC klasse I gemedieerde immuunrespons. Opvallend genoeg was deze tot voor kort nauwelijks bestudeerd.

In **Hoofdstuk 3** hebben we het lot en de dynamiek van intracellulaire peptiden gevisualiseerd in levende cellen. Met behulp van fluorescent gelabelde peptiden laten we zien dat peptiden zijn verdeeld over twee gekoppelde compartimenten in de cel, het cytoplasma en de kern, waar binnen en waar tussen ze zich razendsnel bewegen. De TAP transporter is afwezig aan de

De balans tussen peptide afbraak en presentatie is cruciaal voor een goede MHC klasse I gemedieerde immuunrespons. Opvallend genoeg was deze tot voor kort nauwelijks bestudeerd.

binnenkant van de kernvelop, met als gevolg dat nucleaire peptiden de kern zullen moeten verlaten om te worden gebruikt voor antigeen presentatie. Als dit gebeurt komen deze peptiden de peptidases tegen die zich in het cytoplasma bevinden. De kern vormt dus een veilige plek voor peptiden, te meer omdat we laten zien dat peptiden een interactie aan kunnen gaan met chromatine, wat diffusie terug naar het cytosol voorkomt. De potentiële functie van deze kernaccumulatie is tot nu toe onbekend. Tot slot hebben we de halfwaarde overlevingstijd van peptiden bepaald door chemisch gesynthetiseerde peptidemicroinjecteren die zowel een fluorescente als een licht absorberende groep bevatten. Afbraak door peptidases scheidt de licht absorberende groep van de fluorescente groep, waardoor fluorescentie kan worden gedetecteerd. We laten zien dat de peptidases in het cytosol alle geïnjecteerde peptiden binnen enkele seconden afbreken, hetgeen duidt op een enorme capaciteit van de cel om eiwitten gemarkeerd voor destructie te recycleren tot

losse aminozuren. Het netto resultaat is dat peptide afbraak veel efficiënter is dan translocatie door TAP en de meeste peptiden zullen dus verloren gaan voor antigeen presentatie door MHC klasse I moleculen. Een belangrijke conclusie uit deze bevindingen is dat peptiden die worden gepresenteerd door het immuunsysteem, ofwel relatief ongevoelig moeten zijn voor peptidase activiteit, of in grote hoeveelheden geproduceerd moeten worden.

Vervolgens bekijken we de andere belangrijke route voor antigeen presentatie, de MHC klasse II route (een overzicht vindt men in **Hoofdstuk 4**). Opnieuw bestudeerden we het proces van peptide steekproeven als zijsporang van eiwit afbraak, ditmaal echter van eiwitten die door de cel zijn opgenomen vanuit de omgeving en vervolgens door proteases zijn afgebroken in de endocytische route. MHC klasse II moleculen, inclusief HLA-DR, worden gedirigeerd naar laat-endosomale structuren, genaamd MIIC. Deze compartimenten hebben een opvallende structuur en bestaan uit een limiterende membraan met verscheidene interne membranen. HLA-DR interacteert in de MIIC met HLA-DM, een gespecialiseerd chaperone eiwit dat HLA-DR stabiliseert gedurende peptide uitwisseling. HLA-DM is hierdoor essentieel voor succesvolle peptide belading van MHC klasse II moleculen. In **Hoofdstuk 5** volgden we dit proces in levende cellen door een cellijn te genereren met HLA-DR3/CFP, HLA-DM/YFP en de invariante keten. Met behulp van Fluorescence Resonance Energy Transfer (Fluorescentie Resonante Energie Overdracht, FRET) visualiseerden we vervolgens

1, 2, 3...

Ons afweersysteem heeft drie routes ontwikkeld om vreemde zaken tegen te gaan die ons lichaam proberen binnen te dringen. De MHC klasse I route is functioneel in alle cellen met een kern en controleert continu de intracellulaire eiwit inhoud op potentiële gevaar van binnen uit, zoals virus infecties en tumorigene signalen. Daarentegen controleert de MHC klasse II route materiaal dat is opgenomen door de cel vanuit de buitenwereld, op zoek naar bacteriën en parasieten die extracellulair leven. Deze route is alleen aanwezig in de cellen van het afweersysteem. Tot slot presenteert de CD1 route lipiden van zowel intra- als extracellulaire afkomst, een route die zich lijkt te hebben ontwikkeld om specifieke intracellulaire bacteriën tegen te gaan.

HLA-DR/DM interacties in de MIIC. In tegenstelling tot bevindingen uit *in vitro* experimenten bleken deze interacties niet pH gevoelig, wat opnieuw de noodzaak benadrukt om biologische processen te bestuderen binnen hun normale cellulaire context.

Met behulp van hoge resolutie FRET microscopie konden we laten zien dat HLA-DR/DM interacties alleen plaatsvonden op de interne structuren van de MIIC en niet op de limiterende membraan. Het MIIC kan dus niet langer worden beschouwd als een homogene omgeving, maar bevat verschillende subdomei-

In tegenstelling tot bevindingen uit *in vitro* experimenten bleken deze interacties niet pH gevoelig, wat opnieuw de noodzaak benadrukt om biologische processen te bestuderen binnen hun normale cellulaire context.

nen die selectief de formatie en/of het sorteren van moleculaire complexen ondersteunen. Waaruit deze nieuw beschreven MHC klasse I beladingsdomeinen bestaan is een logische vervolgvraag. Eén kandidaat-familie van eiwitten wekt specifiek de interesse. Van de tetraspanin eiwitten CD63 en CD82 is beschreven dat zij interacties aangaan met HLA-DR en HLA-DM en dat ze bovendien exclusief localiseren naar de interne membranen van de MIIC. Bovendien is een rol in de ondersteuning van peptide belading reeds gesuggereerd in de literatuur. Of deze eiwitten inderdaad een belangrijke rol spelen in de formatie van subvesiculaire microdomeinen is het onderwerp van onze huidige studies.

Eiwitten alleen vertellen echter niet het hele verhaal. De lipide samenstelling van de verschillende subvesiculaire membranen spelen bijna zeker ook een cruciale rol. Door het manipuleren van de lipide fosforylatie machinerie konden we de formatie van interne structuren voorkomen en dus de interactie tussen HLA-DR/DM verbreken. Op identieke wijze vormden phagosomen in een cellulair model van infectie met *Salmonella* ook een limiterende membraan om de geïnternaliseerde bacteriën heen. HLA-DR en HLA-DM gingen geen interactie aan op de *Salmonella*-geïnduceerde vacuole en HLA-DR werd niet beladen met antigenen zolang de bacterie levend bleef. De afwezigheid van HLA-DR en HLA-DM interacties op de limiterende membraan voorkomt lokaal dat MHC

Energetische Resonantie

Fluorescence Resonance Energy Transfer (Fluorescentie Resonante Energie Overdracht), oftewel FRET, is een fysisch fenomeen dat kan ontstaan als twee fluoroforen zeer dicht bij elkaar in de buurt komen, waarna energie van de één wordt overgedragen aan de andere. Dit proces is zeer gevoelig voor de afstand tussen de twee fluoroforen en is daarom uitermate geschikt om inter- en intramoleculaire interacties te bestuderen.

FRET als Moleculaire Lineaal

In 1948 publiceerde Th. Förster zijn werk *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, waarin hij beschrijft dat de efficiëntie van FRET tussen twee fluoroforen met de macht zes afneemt met hun onderlinge afstand. Zo is de term Förster radius ontstaan, de afstand tussen twee fluoroforen waar de FRET efficiëntie half-maximaal is. Juist omdat FRET zo gevoelig is voor afstand, functioneert het als een soort moleculaire lineaal, ook al zijn absolute metingen vaak niet mogelijk vanwege de onzekerheid in fluorofoor oriëntatie en positie.

Jellyfish Revival

FRET dankt zijn heropleving aan de Grote Oceaan kwal *Aequorea victoria* die bekend staat om het groene licht dat hij uitstraalt. In het begin van de jaren 90 ontdekten wetenschappers dat dit licht wordt geproduceerd door twee eiwitten. Het eerste, aequorin, produceert blauw licht dat vervolgens wordt omgezet in groen licht door een tweede eiwit dat daarom Green Fluorescent Protein, oftewel GFP wordt genoemd. Sindsdien hebben wetenschappers een groot aantal kleurvarianten gemaakt. Twee daarvan, CFP (cyaan) en YFP (geel) zijn zeer geschikt voor FRET metingen en hebben tot hernieuwde interesse voor deze techniek geleid.

klasse II moleculen worden beladen in phagosomen, wat ertoe kan leiden dat deze bacteriën succesvol het immuunsysteem kunnen omzeilen. Blijft echter de vraag of *Salmonella* actief de formatie van interne structuren voorkomt als onderdeel van haar grote arsenaal aan manipulerende activiteiten ter misleiding van het immuunsysteem, of dat het slechts een consequentie is van de grootte van de bacterie. Tevens is het nog steeds onduidelijk in hoeverre *Salmonella* presentatie van haar antigenen via MHC klasse II moleculen volledig kan onderdrukken. Wij observeerden name-

Summary in Dutch

lijk functionele HLA-DR/DM interacties in andere vesicels binnen dezelfde cel. Afgescheiden materiaal door de bacterie dat uiteindelijk terecht komt in één van deze MIIC's heeft een grote kans toch gepresenteerd te worden.

In **Hoofdstuk 6** komen we een ander voorbeeld tegen van een fijne balans tussen een effectieve immunrespons en ontsnapping aan het immuunsysteem, opnieuw met *Salmonella* in de hoofdrol. Dit keer kijken we naar B cellen, een type witte bloedcel dat antilichamen produceren kan en in het algemeen een lage phagocyterende capaciteit heeft. We laten echter zien dat B cellen na het activeren van hun B cel receptor (BCR) snel en effectief grote partikels kunnen opnemen, waaronder complete *Salmonella* bacteriën. We tonen aan dat B cellen die *Salmonella* herkennen en opnemen inderdaad voorkomen in het bloed en dat het naïeve maar vooral ook memory B cellen zijn. Ondanks dat de B cel de opname initieert door binding aan zijn specifieke BCR, is het de bacterie die de daadwerkelijke opname faciliteert. Eenmaal binnen is *Salmonella* niet in staat te repliceren, maar de B cel is ook niet in staat om de slapende bacterie te doden. Echter de B cel is niet inert ten opzichte van zijn gast. Hij reageert als een echte professionele antigeen presenterende cel en neemt monsters van de bacterie die vervolgens worden gepresenteerd aan in de omgeving verkerende CD4⁺ T cellen. Sterker nog, de massale activatie van de BCR en de opname van *Salmonella* maakt dat de B cel interleukine-6 begint te produceren en te excreteren. Daarnaast begint hij de productie van *Salmonella* antilichamen. Dit autocriene gedrag wordt verder gestimuleerd door geactiveerde

We hebben een bug

De meeste bacteriën in ons lichaam leven buiten de cel, waar ze relatief makkelijk zijn te ontdekken door het afweersysteem. Een aantal bacteriën heeft daarom besloten om zich te verstoppen en hebben zich zo ontwikkeld dat ze intracellulair kunnen leven. Pathogenen zoals *Salmonella*—de veroorzaker van *Salmonella* voedselvergiftiging—, *Mycobacterium tuberculosis* en *Mycobacterium leprae* gaan de cel binnen, overleven daar en planten zich voort in speciale organellen, phagosomen genaamd, uit het zicht van het afweersysteem. Om dit proces mogelijk te maken secreteren deze bacteriën speciale factoren, effector eiwitten, die de normale celmachinerie tot moduleren dat het de bacterie helpt binnen te komen en te overleven.

autologe T cellen, die hun rol als helper T cellen dus waarmaken. Toch, zolang de bacterie binnen in de B cel blijft weet het op die manier het immuunsysteem te omzeilen. Misschien is dat dan ook de reden dat het merendeel van de B cellen actief de bacterie weer excreteert. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat dit simpelweg een consequentie is van B cel activatie, één met een potentieel zeer groot gevaar omdat de uitgescheiden bacterie nog springlevend is en in staat is om andere cellen te infecteren. We laten op directe

We laten op directe wijze zien dat de B cel een schuilplaats vormt waarin *Salmonella* zich tijdelijk kan verstoppen en waaruit de bacterie later kan ontsnappen om vervolgens een andere cel te infecteren en zodoende op afstand een nieuwe infectiehaard te creëren.

wijze zien dat de B cel een schuilplaats vormt waarin *Salmonella* zich tijdelijk kan verstoppen en waaruit de bacterie later kan ontsnappen om vervolgens een andere cel te infecteren en zodoende op afstand een nieuwe infectie haard te creëren. Ook al heeft de rol van de B cel in *Salmonella* infectiebiologie hernieuwde interesse opgewekt, is in het verleden de meeste aandacht uit gegaan naar de rol van macrofagen. In het kader van onze huidige resultaten is het echter waard om de rol van de B cel verder te bekijken, zeker als het gaat om verspreiding van *Salmonella* vanuit de primaire bron van infectie. *Salmonella* localiseert voornamelijk naar de milt en lymfknoepen, locaties die het heel goed zou kunnen bereiken door transport via B cellen. Dat dit tijdelijke omzeilen van het immuunsysteem voldoende is om *Salmonella* te beschermen in de loop van de infectie lijkt onwaarschijnlijk. De B cel wordt immers geactiveerd en vergaart genoeg antigenen voor de start van een humorale immunrespons. Toch zou het *Salmonella* een voorsprong kunnen geven die moeilijk blijkt tegen te gaan.

Meer uitgebreide Nederlandstalige informatie en illustraties zijn te vinden op:
<http://www.mekentosj.com/science/mhc>

Drug Resistentie

Reeds in 1896 beschreef Thomas Beatson dat het verwijderen van de eierstokken in een vergevorderd stadium van borstkanker vaak tot een opmerkelijke verbetering leidde. Daarmee had hij het stimulerende effect ontdekt van het vrouwelijk eierstokhormoon (oestrogeen) op borstkanker, ver voordat het hormoon zelf ontdekt werd. Zijn werk vormde de basis van het moderne gebruik van hormoontherapie voor de behandeling en preventie van borstkanker. Veel later pas werd de cellulaire tegenhanger ontdekt die verantwoordelijk was voor de beschreven effecten, de oestrogeen receptor. Nu weten we dat deze receptor, die deel uitmaakt van de familie van nucleaire hormoonreceptoren (een overzicht vindt men in **Hoofdstuk 7**), een essentiële rol speelt in de vorming en het onderhoud van de seksuele reproductieorganen en dus ook, zoals Beatson had ontdekt, in borstkanker. Daarom worden oestrogeen receptor-positieve borstkankerpatiënten vaak behandeld met tamoxifen, een zeer potent en veel gebruikt anti-oestrogeen. Resistentie tegen deze drugs vormt een groot probleem in de kliniek. De terugkeer van tumoren in tamoxifen-behandelde, resistente patiënten vindt vaak nog plaats na vele jaren van behandeling. Om deze reden trachten wij een test te ontwikkelen waarin resistente gevallen al op voorhand kunnen worden geïdentificeerd, wat doktoren in staat zou stellen om een rationele keuze te maken voor de meest geschikte anti-oestrogeen therapie.

In **Hoofdstuk 8** beschrijven we hoe we een gevoelige assay hebben ontwikkeld die het mogelijk maakt om conformationele veranderingen binnen Oestrogeen Receptor α (ER α) direct te visualiseren en waarmee we het mechanisme konden bestuderen waardoor de receptor drug resistent wordt. We koppelden de

Resistentie tegen deze drugs vormt een groot probleem in de kliniek. De terugkeer van tumoren in tamoxifen-behandelde, resistente patiënten vindt vaak nog plaats na vele jaren van behandeling.

humaan ER α aan twee kleurvarianten van het groen fluorescent eiwit (GFP), YFP (geel) aan de N- en CFP (cyaan) aan de C-terminus. Vervolgens maakten we een stabiele cellijn met deze chimere receptor. Vervolgens voerden we FRET metingen uit op de

Borstkanker

Borstkanker is de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen in de westerse wereld. Helaas zullen in Nederland 1 op de 9 vrouwen uiteindelijk borstkanker krijgen. Er is weinig bekend over de factoren die borstkanker kunnen veroorzaken, al is 5-10% van de gevallen erfelijk. Behalve voor vrouwen uit deze risicogroep is borstkanker voornamelijk een ziekte die op latere leeftijd pas voorkomt, met toenemend risico voor vrouwen ouder dan 75. Indien mogelijk heeft chirurgisch verwijderen van de tumor de voorkeur. Daarnaast is tumorgroei vaak afhankelijk van de aanwezigheid van hormonen en een functionele oestrogeen receptor. Daarom wordt vaak een anti-oestrogeen behandeling toegepast als adjuvante therapie na chirurgie.

kern van een enkele cel. We konden geen FRET verandering waarnemen na de additie van de natuurlijke ligand oestradiol, maar we observeerden een snelle FRET verandering na toevoeging van anti-oestrogenen. Hieruit bleek dat ER α een conformationele verandering had ondergaan die de inactieve staat van de receptor representeerde. Met behulp van deze assay bestudeerden we vervolgens de effecten van verschillende factoren die eerder al waren geassocieerd met anti-oestrogeen resistentie.

Onze experimenten lieten zien dat fosforylatie van serine-305 in de scharnier regio van ER α door Proteïne Kinase A (PKA) resulteerde in tamoxifen-resistentie. Tamoxifen kon nog steeds binden aan de receptor, maar faalde om de inactieve conformatie te induceren en leidde in plaats daarvan zelfs tot stimulatie van de receptor. In klinische monsters vonden we dat een negatieve regulator van PKA, PKA-R1 α , lager tot expressie kwam en dat dit correleerde met tamoxifenresistentie in borsttumoren reeds voor behandeling. Gedwongen lagere expressie van dit inhiberend gedeelte van PKA met behulp van RNAi hield de receptor in de actieve conformatie en voorkwam werking van tamoxifen, wat uiteindelijk leidde tot tamoxifen gestimuleerde celgroei. Activatie van PKA verandert op deze wijze dus tamoxifen van een oestrogeen receptor-antagonist in een agonist, een situatie die uiterst ongewenst is, maar die inderdaad wordt waargenomen in de kliniek als tumoren kleiner worden nadat wordt gestopt met tamoxifen-behandeling. Belangrijk is dat deze vorm van resistentie niet werd waargenomen bij een ander anti-

Wondermiddel

Eén van de meest krachtige en veelgebruikte anti-oestrogenen is tamoxifen, een medicijn dat kan worden gezien als het meest succesvolle anti-kanker middel ooit. Zowel in preventieve als adjuvante therapie, als in de behandeling van uitzaaïngen is tamoxifen effectief werkzaam in ongeveer 50% van de gevallen. Zeer belangrijk is dat tamoxifen relatief weinig bijwerkingen kent en het bovendien oraal kan worden ingenomen. Een nadeel van tamoxifen blijft dat het medicijn zeer langdurig moet worden ingenomen, over het algemeen 5 jaar of langer, en dat er in veel gevallen toch resistentie optreedt tegen dit medicijn.

oestrogeen, Fulvestrant, dat ook beschikbaar is in de kliniek. De ontwikkeling van een klinische assay die *a priori* uitspraak kan doen over tamoxifen-resistentie kan daarom leiden tot een duidelijke verbetering voor patiënten omdat deze dan behandeld kunnen worden met een alternatief, meer stringent anti-oestrogeen. Op dit moment testen wij het gebruik van een antilichaam dat specifiek gefosforyleerd serine-305 herkend op ER α . Positieve kleuring van tumormateriaal met dit antilichaam is een indicatie van verhoogde PKA activiteit, en dus tamoxifen-resistentie. Deze patiënten kunnen dan beter behandeld worden met Fulvestrant.

Onze FRET methodologie had al laten zien dat het effectief onderscheid kon maken tussen twee verschillende anti-oestrogenen, tamoxifen en Fulvestrant. Beide ER α antagonisten gaven in verschillende mate een FRET respons na receptorbinding en waren verschillend gevoelig voor modificatie van de receptor door cellulaire signaleringsroutes. Kristallografische studies van het Ligand Bindend Domein (LBD) van de receptor hadden al laten zien dat de receptor specifieke conformaties aanneemt na binding van verschillende anti-oestrogenen, wat de verschillen in de geobserveerde FRET respons kan verklaren. Deze studies konden echter weinig informatie verschaffen over hoe deze verschillen zich vertalen in patronen van anti-oestrogeen resistentie. Daarom gebruikten we in **Hoofdstuk 9** opnieuw onze FRET analyse voor de karakterisatie van een grotere set van verschillende anti-oestrogenen en maakten een profiel van hun specifieke benodigheden voor resistentie.

We laten zien dat de negen geteste anti-oestrogenen kunnen worden verdeeld in zes groepen op basis van

hun gevoeligheid voor de PKA en/of Mitogen geactiveerde Proteïne Kinase (MAPK) modificaties van ER α die leiden tot resistentie. Aan de gevoelige kant van het spectrum vinden we tamoxifen, waarvoor een enkele modificatie reeds genoeg is om de receptor resistent te maken. Aan de andere kant vinden we ICI-164.384 welke zelfs geen resistentie vertoont na gecombineerde activatie van zowel de PKA als MAPK routes. De resultaten van onze FRET analyse kloppen met die verregen met behulp van meer conventionele methodes om ER gemedieerde transcriptionele activiteit te meten. Belangrijk is dat resistentie zoals met FRET bepaald, direct correleert met groei van ER α positieve borstkankercellen na behandeling met de verschillende anti-oestrogenen. FRET analyse is dus een snelle en directe manier om gevoeligheid voor anti-oestrogenen te meten in ER positieve cellen. Het uit deze studie resulterende anti-oestrogeen profiel maakt het mogelijk om de verschillende beschikbare anti-oestrogenen te rangschikken op basis van hun sterkte, en geeft een rationele basis waarop patiënten kunnen worden gekoppeld aan een adequate anti-oestrogeen therapie.

Een vraag die blijft is hoe fosforylatie resistentie kan induceren en zelfs een ER α antagonist zoals tamoxifen kan doen veranderen in een agonist. In **Hoofdstuk 10**

Het resulterende anti-oestrogeen profiel maakt het mogelijk om de verschillende anti-oestrogenen te rangschikken op basis van hun sterkte, en geeft een rationele basis waarop patiënten kunnen worden gekoppeld aan een adequate anti-oestrogeen therapie.

hebben we meer inzicht verkregen in het mechanisme achter dit fenomeen. Na binding van de natuurlijke ligand oestradiol bindt de oestrogeen receptor op specifieke plaatsen aan het DNA, Oestrogeen Responsieve Elementen genaamd. Tegelijkertijd veroorzaakt een conformationele binding in het Ligand Bindend Domein de recruitering van een aantal co-factoren die essentieel zijn voor het doen plaatsvinden van transcriptie. Het is deze laatste stap die wordt beïnvloed door anti-oestrogenen. Om te begrijpen hoe fosforylatie van ER α transcriptie toestaat in de aanwezigheid van anti-oestrogenen, bekeken we de interactie

met Steroïde Receptor Cofactor 1 (SRC-1). We laten zien met behulp van via Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP, fluorescentie herstel na doving), en mammalian 2-hybrid studies dat fosforylatie van serine-305 door PKA niet de bindingsaffiniteit van SRC-1 aan ER α beïnvloedt. Interessant is dat onze proeven laten zien dat zelfs in de aanwezigheid van anti-oestrogenen SRC-1 nog steeds aan de receptor kan binden. Veel van de SRC-1 recruteringsproeven die worden beschreven in de literatuur worden alleen met het Ligand Bindend Domein uitgevoerd en deze suggereren dat SRC-1 de receptor niet kan binden in

Veel proeven die worden beschreven in de literatuur worden alleen met het Ligand Bindend Domein uitgevoerd en deze suggereren dat SRC-1 de receptor niet kan binden in de aanwezigheid van anti-oestrogenen. Onze data laten zien dat dit niet geldt voor andere bindingsdomeinen in ER α .

de aanwezigheid van anti-oestrogenen. Dit moge zo zijn voor de LBD alleen, maar onze data laten zien dat dit niet geldt voor andere bindingsdomeinen in ER α . De affiniteit van deze LBD onafhankelijke binding wordt echter niet beïnvloed door PKA stimulatie en kan dus niet verantwoordelijk worden gehouden voor de geobserveerde tamoxifen-resistentie na fosforylatie van serine-305. Daarom besloten we de interactie tussen SRC-1 en ER α in detail te bekijken.

Confocale FRET microscopie tussen ER α -CFP en SRC-1-YFP lieten een verandering zien van de oriëntatie tussen de twee eiwitten na PKA stimulatie en tamoxifenbehandeling. Deze veranderde oriëntatie was inderdaad afhankelijk van serine-305 fosforylatie. Immuno-fluorescentie studies lieten verder zien dat RNA Polymerase II kon worden gerecrueteerd in de aanwezigheid van tamoxifen, wat een sterke aanwijzing is dat deze veranderde oriëntatie transcriptioneel actief is. Wij stellen een model voor waarin tamoxifen-resistentie niet wordt verklaard door verschillen in eiwit affiniteiten, maar door verschillen in oriëntatie van het SRC-1/ER α complex na serine-305 fosforylatie. Dit model zorgt voor direct mechanistisch inzicht in de details van tamoxifen-resistentie.

Herstel na lichtflits

Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP, herstel van fluorescentie na doving m.b.v. licht) is al bijna drie decennia beschikbaar voor wetenschappers. De techniek is rond 1976 in het laboratorium van Watt W. Webb ontwikkeld, toen zij geïnteresseerd waren in de laterale mobiliteit van de Acetylcholine Receptor (AChR). De introductie van het Groen Fluorescerende Eiwit (GFP) en de ontwikkeling van commercieel verkrijgbare op confocale microscopie gebaseerde lichtdovings (photobleaching) methodes hebben geleid tot een opleving van deze fluorescentie techniek aan het eind van de jaren 90. Een bepaalde regio in de cel wordt selectief aangestraald met een laser van hoge intensiteit waardoor de geraakte GFP eiwitten permanent doven. Het herstel van fluorescentie dat optreedt door diffusie van nabij gelegen, niet gedoopte GFP eiwitten wordt gemeten in de tijd met een laser met lagere intensiteit. Afhankelijk van het te bestuderen eiwit, kan het herstel van fluorescentie informatie verschaffen over de snelheid waarmee een eiwit zich verplaatst, over binding en dissociatie met partner eiwitten, of over transport processen.

Een aantal vragen blijft onbeantwoord. Geldt ons model bijvoorbeeld ook voor andere co-factoren als SRC-2 en 3 en wat is hun relatieve contributie? Ook kunnen we niet verklaren waarom de mate van gen transcriptie onder tamoxifen condities bij lange na niet gelijk is aan die geïnduceerd door oestradiol. Ondanks dat polymerase II wordt gerecrueteerd in beide gevallen moeten er dus toch significante verschillen zijn in het mechanisme waarmee transcriptie uiteindelijk wordt bewerkstelligd. Het is echter duidelijk dat in een situatie waar eiwit-eiwit oriëntatie in plaats van eiwit-interacties belangrijk zijn, dat geavanceerde microscopische technieken een cruciale rol spelen om de complexe cascade van gebeurtenissen te begrijpen die uiteindelijk leiden tot anti-oestrogeen resistentie.

Meer uitgebreide Nederlandstalige informatie en illustraties zijn te vinden op:
<http://www.mekentosj.com/science/er>