



Viti i VI-të i Botimit, Nr.2,  
Dhjetor 2015

# STUDIME MBI BASHKËVEPRIMIN E KOMPLEKSIT EGF/EGFR NËPËRMJET REZONANCËS PLAZMONIKE TË SIPËRFAQES

Johana Hysomema

Departamenti i Infermierisë dhe Fizioterapisë, Albanian University, Shqipëri

Adresë Kontakti: [johanahysomema@gmail.com](mailto:johanahysomema@gmail.com)

## Pëmbledhje

**Qëllimi:** Anomalitë e receptorit për faktorin e rritjes së epidermës (EGFR) janë të pranishme në të gjitha aspektet e procesit të karcinogjenezës: shumëfishim qelizor, bllokim i apoptozës (vdekje qelizore e programuar), angiogjenezë dhe metastatizim. Shprehja mbi normën e EGFR është raportuar në lloje të ndryshme tumoresh, kryesisht në atë të kolonit, të qafës dhe kokës apo të mushkërive, në të cilët korrelohet me rezultate klinike të dobëta. Modifikimet e mekanizmit të aktivizimit të EGFR, që ndodh pas bashkëveprimit me ligandin e tij natyral (EGF), dhe/ose ndërhyrja në rrugët e transduksionit brendaqelizor të sinjalit të këtij receptorit, vlerësohen si strategji premtuese për zhvillimin e terapive të reja dhe selektive kundër karcinomave. Në këtë kontekst, ky studim fokusohet në ekzaminimin e bashkëveprimit EGF/EGFR nëpërmjet rezonancës plasmonike të sipërfaqes (SPR) duke përdorur tre modele të ndryshme eksperimentale.

**Materialet dhe metodat:** EGFR i përftuar nga një linjë qelizash të karcinomës së epidermës, A431 [1], e njohur për shprehjen e sasive të mëdha të receptorit, u imobilizua mbi një *chip* të sensorit SPR për të studiuar bashkëveprimin me EGF. Më pas, edhe vetë EGF u imobilizua për të analizuar bashkëveprimin e tij me EGFR të gjendur në dy lizate të ndryshme qelizash A431. Në të dyja rastet, u përdor teknika e krijimit të bishtresës lipidike në sipërfaqen e sensorit (OSR). Paralelisht, një formë komerciale e EGFR të purifikuar u imobilizua në biosensor, me anë të lidhjes aminike dhe bashkëveprimi me EGF rezultoi pozitiv.

**Rezultatet:** Eksperimentet në SPR konfirmuan bashkëveprimin EGF/EGFR me një  $KD = 368 \pm 0.65$  nM në përputhje me vlerat e sugjeruara në literaturë për bashkëveprimin e receptorit me ligandin e tij natyral [2].

**Konkluzionet:** Bashkëveprimi EGF/EGFR është një model i vështirë, por shumë i rëndësishëm që luan një rol thelbësor në qartësimin e njohurive për projektimin dhe krijimin e barnave të reja, të afta të modifikojnë bashkëveprimin e EGFR me ligandët e tij. Nga ana tjetër, SPR mundëson studimin e bashkëveprimit EGF/EGFR në kohë reale dhe me një shkallë të lartë sensitiviteti dhe specificiteti, duke rezultuar një mjet i ideal për studimet që kanë si objekt zbulimin e barnave të reja.

**Fjalë çelës:** EGF, EGFR, bashkëveprim, rezonancë e plazmoneve të sipërfaqes.

## EGF/EGFR COMPLEX INTERACTION STUDIES BY SURFACE PLASMON RESONANCE

### Abstract

**Background:** Epidermal growth factor receptor (EGFR) abnormalities are associated with all

aspects of carcinogenesis: cell proliferation, inhibition of apoptosis, angiogenesis and metastasis. Overexpression of EGFR has been reported in several tumor types, most notably colorectal, head and neck, and lung cancers, where it typically correlates with poor clinical outcomes. Thus, interference with EGFR receptor activation, owing to the binding of ligands such as epidermal growth factor (EGF), and/or with its intracellular signal transduction pathways represents a promising strategy for the development of novel and selective anticancer therapies. This work was focused on surface plasmon resonance (SPR) investigation of the direct EGF/EGFR complex interaction using three different experimental approaches.

**Materials and Methods:** EGFR from an overexpressing human epidermoid carcinoma cell line, A431 [1], was immobilised, on a sensor chip to study its interaction with EGF. Subsequently, EGF was immobilised to investigate its interaction with EGFR from A431 cell lysate. A new approach called on surface lipid bilayer reconstitution (OSR), was used in both methods. Besides, a commercially available purified EGFR was immobilised by amine coupling chemistry on SPR sensor chip and its interaction to EGF resulted to be positive.

**Results:** SPR experiments confirmed the EGF/EGFR interaction with a  $K_D = 368 \pm 0.65$  nM, according to the literature suggested interaction between the receptor and its natural ligand molecule [2].

**Conclusions:** EGF/EGFR complex interaction represents a challenging but important system that can lead to significant knowledge about the design and screening of new drugs intended to interfere with EGFR binding activity. On the other hand, SPR technology allows the study of EGF/EGFR complex interaction in real-time and label-free with a high degree of sensitivity and specificity thus representing an important tool for drug discovery studies.

**Key words:** *EGF, EGFR, interaction, surface plasmon resonance.*

## Hyrje

Funksionimi jo normal i EGFR është vrojtuar në një shumëllojshmëri të gjerë karcinomash, përfshirë atë të zorrës së trashë, të kokës dhe qafës, të gjirit, të fshikëzës së urinës apo karcinomën e mushkërive jo me qeliza të vogla (NSCLC) [3]. Duke pasur parasysh rolin thelbësor të EGFR në procesin e rritjes qelizore, kuptohet se si aktivizimi i rrugëve të sinjalizimit brendaqelizor të këtij receptori i siguron qelizës tumorale një sërë avantazhesh për të mbijetuar edhe në kushte jo të përshtatshme [4]. Për vetë rëndësinë që paraqet familja e receptorëve të EGF në biologjinë e zhvillimit të karcinomave, EGFR paraqitet si një objektiv premtues për zhvillimin e terapive të reja onkologjike të cilat synojnë bllokimin e sinjalizimit receptorial. EGFR aktivizohet kur një ligand si EGF lidhet me domenin e jashtëqelizor të receptorit. Ky bashkëveprim shkakton ndryshime konformacionale, të cilat kushtëzojnë homodimerizimin apo heterodimerizimin e EGFR me receptorë të tjerë [5], duke shkaktuar kështu aktivizimin e domenit tirozin kinazë të receptorit me pasojë fosforilimin e tirozinave të pozicionuara në domenin e tij karboksilik [6]. Këto evente shkaktojnë aktivizimin e mëpasëm të një rrjeti kompleks sinjalizimi brendaqelizor, i cili kontrollon rritjen qelizore, shumëfishimin, mbijetesën, invazionin, migrimin si dhe, procesin e angiogjenezës [7]. Modifikimi i sinjalizimit të receptorit EGFR mundësohet falë bllokimit të aktivitetit tirozin kinazë (domenit katalitik) të receptorit me molekula të vogla inhibuese (TKIs) ose, falë përdorimit të antitropave monoklonalë, të cilët janë në gjendje të bllokojnë domenin jashtëqelizor të receptorit duke mos lejuar kështu bashkëveprimin e tij me EGF [8, 9, 10, 11]. Aktualisht, janë në përdorim një numër i madh inhibitorësh të EGFR të cilët kanë treguar efikasitet të lartë në frenimin e procesit të rritjes qelizore dhe janë në gjendje të indukojnë apoptozën e qelizave kanceroze [12]. Në ditët e sotme, synohet identifikimi i biomolekulave specifike, të cilat shërbejnë si shënjestër për terapitë onkologjike me qëllim përdorimin sa më efikas të barnave antitumorale. Në këtë kuadër, hetimi i bashkëveprimit të kompleksit EGF/EGFR paraqitet si një sfidë e vështirë, por e rëndësishme që mund të sigurojë njohuri të përgjithshme dhe të rëndësishme mbi bashkëveprimet receptor-

ligand, me synim identifikimin e molekulave optimale për të projektuar barna të përshtatshme për një terapi selektive të kancerit.

Teknologjia e biosensorëve të rezonancës së plazmonëve të sipërfaqes (SPR) është një teknikë optike që mundëson monitorimin e drejtpërdrejtë të bashkëveprimeve biomolekulare, ndërkohë që ato ndodhin [13]. SPR përdoret për të matur kinetikën e reaksioneve dhe për të llogaritur konstantet e afinitetit të bashkëveprimeve biomolekulare [14, 15]. Në rastin më të thjeshtë të një eksperimenti në SPR, njëra nga molekulat bashkëvepruese imobilizohet (fiksohet) në sipërfaqen e aktivizuar të një biosensori ndërkohë që një tretësirë ku ndodhet molekula tjetër bashkëvepruese rrjedh mbi sipërfaqen e biosensorit. Bashkëveprimi i molekulës bashkëvepruese me partneren e saj të imobilizuar në biosensor shkakton një ndryshim në peshën specifike mbi sipërfaqen e biosensorit duke rezultuar në një ndryshim të indeksit të refraksionit në sipërfaqen e biosensorit dhe në zhvendosjen e këndit të rezonancës së dritës së reflektuar. Të gjitha këto dukuri monitorohen në kohë reale duke raportuar ndryshimet e këndit të rezonancës (para dhe pas bashkëveprimit), pra të sinjalit të rezonancës në funksion të kohës [16, 17].

Në këtë studim, janë projektuar dhe ekzaminuar qasje të ndryshme eksperimentale të cilat sollën në krijimin e një metode efikase për vlerësimin e bashkëveprimit të kompleksit EGF/EGFR nëpërmjet SPR. Kjo metodë e drejtpërdrejtë dhe e përdorshme në kohë reale, paraqitet si një mjet shumë i rëndësishëm që lejon *screening*-un e molekulave të reja të afta të bashkëveprojnë dhe të bllokojnë EGFR për të mundësuar identifikimin e barnave optimale për një terapi antitumorale sa më efikase.

## **Materialet dhe Metodat**

### ***1. Imobilizimi i EGFR të përftuar nga lizati total i qelizave A431 dhe bashkëveprimi me EGF***

Mbi biosensorin e SPR u imobilizua EGFR i përftuar nga lizati total i linjës qelizore humane të carcinomës së epidermës, A431, e njohur për shprehjen e sasive të mëdha të këtij receptori [18, 19]. EGFR u imobilizua falë përdorimit të dy antitropave që lidhen me domenin e tij karboksilik për të mundësuar një orientim hapësinor specifik dhe më pas, për të siguruar një ambient sa më të ngjashëm me atë natyral, u rikrijua rreth receptorit direkt në sipërfaqen e *chip*-it L1 të biosensorit një bishtresë lipidike.

#### *Solubilizimi i receptorit EGFR*

Përafërsisht  $10^7$  qeliza u lizuan në 1 mL tampon RIPA të modifikuar, ose në 1 mL tampon të përbërë nga PBS, pH 7.4, 0.01 mg/mL të secilit inhibitor (aprotininë, antipainë, leupeptinë, pestatinë), 0.1 mM fenilmetil sulfonil fluori (PMSF), 0.5 mM vanadat natriumi dhe 1% Triton X-100 në 4°C për 45 min. Lizatet qelizore u centrifuguan me shpejtësi 14,000 rpm për 30 min në 4°C.

#### *Përgatitje e përzierjes lipide/detergjent*

U përdorën alikuota me 2.5 mg përzierje lipidesh të përbërë prej 16.7% fosfatidiletanolaminë, 10.6% fosfatidilserinë, 9.6% fosfatidilkolinë, 2.6% acid fosfatik, 1.6% fosfatidil inozitol, 58.7% lipide të tjera (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) të cilat u solubilizuan në tampon HBS në praninë e 30 mM të detergjentit n-Oktill-b-D-glukozid (Anatrace, Maumee, OH).

#### *Imobilizimi i EGFR dhe bashkëveprimi me EGF*

Antitrupat kundër EGFR (abcam plc, Cambridge, UK dhe Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) u solubilizuan në përputhje me instruksionet e prodhuesve. 25 µg/mL e secilit antitrup u imobilizua në biosensor nëpërmjet reaksioneve të lidhjes aminike, duke injektuar secilin mbi biosensor për 7 minuta me një fluks prej 5 mL/min.

Lizati qelizor që përmbante EGFR u injektua mbi sipërfaqet e biosensorit L1 ku më parë ishin imobilizuar

antitruapat për 20 min me fluks 5 mL/min duke përdorur funksionin COINJECT. Paralelisht me injektimin e EGFR u rikrijua mbi biosensor një bishtresë lipidike (OSR) falë injeksionit të përzierjes lipidike për 10 min me fluks 5 mL/min [20]. Si sipërfaqe referimi (kontroll negativ) u përdorën sipërfaqe ku ishin imobilizuar antitruapat dhe ku u injektua vetëm tretësira lipidike, por jo lizati qelizor.

Për të studiuar bashkëveprimin EGF/EGFR, mbi sipërfaqet aktive dhe ato të referimit u injektuan përqendrime rritëse të EGF 20 nM-1 µM (PreproTech, Rocky Hill, NJ) dhe tamponi HBS (kontroll) për 3 min me fluks 30 µL/min. EGF u lejua të vetëshkëputej për 10 min përpara se të procedohej me rigjenerimin e sipërfaqes së biosensorit.

Të gjitha eksperimentet u zhvilluan me instrumentin Biacore 2000 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) të pajisur me *chip*-in L1 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) dhe tampon rrjedhës HBS.

## **2. Imobilizimi i EGF dhe bashkëveprimi me EGFR**

EGF u imobilizua mbi biosensor për të testuar bashkëveprimin e tij me EGFR të pranishëm në dy lizate të ndryshme të qelizave A431. 10<sup>7</sup> qeliza u lizuan për 30 min në akull me 1mL PBS që përmbante 10mM EDTA, 1mM PMSF, 0.1 mg/mL aprotininë dhe 1% TritonX-100 (tampon A) [21] ose 20 min në +4°C me 1 mL 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM vanadat natriumi, 5 mg/mL aprotininë, 1 mM EDTA dhe 1mM PMSF (tampon B) duke centrifuguar në të dyja rastet me 10,000 rpm për 15 min në +4°C [22].

100 mg/mL EGF u imobilizua mbi biosensorin L1 për 10 min me fluks 5 mL/min nëpërmjet reaksionit të lidhjes aminike. Një sipërfaqe referimi (kontroll negativ) u trajtua njësoj si sipërfaqja aktive, por pa injeksionin e EGF. Lizatet qelizore u injektuan për 20 min me fluks 10 mL/min mbi sipërfaqen e biosensorit ku ishte imobilizuar EGF. Më pas, u rikrijua një bishtresë lipidike (OSR) duke injektuar tretësirën lipidike për 10 min me fluks 10 mL/min.

Eksperimentet u zhvilluan me instrumentin Biacore S51 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) dhe tampon rrjedhës HBS.

## **3. Imobilizimi i EGFR të purifikuar dhe bashkëveprimi me EGF**

56 nM EGFR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u imobilizua mbi biosensor nëpërmjet reaksionit të lidhjes aminike për 12 minuta me fluks 5 mL/min. Sipërfaqja e referimit (kontroll negativ) nuk iu nënshtrua injeksionit të EGFR.

EGF u injektua mbi sipërfaqen e biosensorit për 7 min me fluks 5 mL/min në triplikatë për përqendrime rritëse 15 nM-2 µM. EGF u lejua të vetëshkëputej për 5 min përpara se të procedohej me rigjenerimin e biosensorit. U përdor instrumenti Biacore S51 i pajisur me *chip*-in L1.

Të gjitha eksperimentet e përmendura më sipër u përsëritën të paktën katër herë.

## **Rezultatet**

### **1. Bashkëveprimi i EGF me EGFR e imobilizuar, të përftuar nga lizati total i qelizave A431**

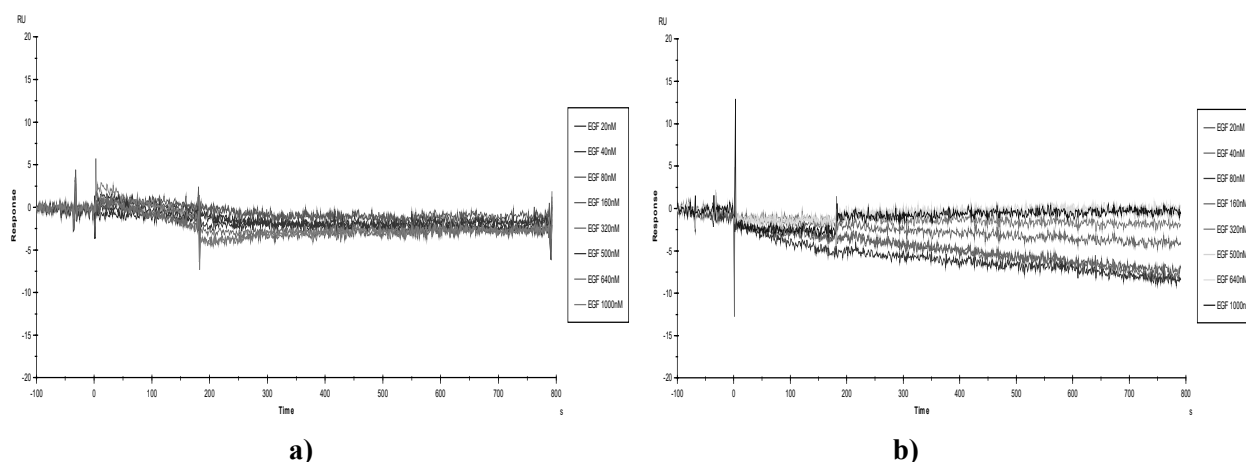
Lizati i qelizave A431 u përdor si burim i receptorit të EGF për imobilizim në sipërfaqet L1 të biosensorit. Për një orientim sa më të përshtatshëm të receptorit në sipërfaqen e sensorit, dy antitruapa Abcam Plc (Cambridge, UK) dhe Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) që lidhin domenin karboksiterminal të EGFR, u imobilizuan paraprakisht mbi biosensor me densitet të njëjtë dhe rezultuan në 10-13 kRU.

Mbi këto sipërfaqe të mbuluara me antitruapa u injektua lizati i qelizave A431 për 20 min dhe menjëherë u procedua me krijimin e bishtresës lipidike nëpërmjet funksionit COINJECT çka rezultoi, në të dyja rastet e përdorimit të lizateve në tampon RIPA apo PBS, në 600-750 RU.

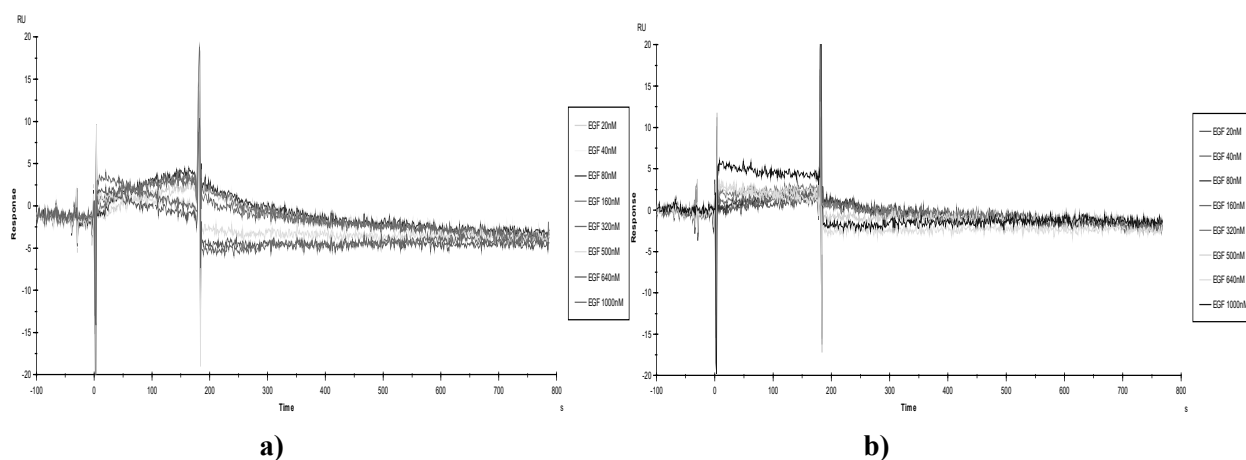
Përqendrime rritëse të EGF (20 nM-1 µM) dhe tamponi HBS (kontroll) u injektuan mbi sipërfaqet aktive

dhe të referimit për 3 min me fluks 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  dhe vetëshkëputja e EGF u lejua për 10 min përpara se të procedohej me rigjenerimin e biosensorit.

Sikurse tregohet në figurën 1, bashkëveprimi me EGF nuk rezultoi pozitiv duke treguar se kur u përdor si burim i receptorit lisati qelizor në PBS sasi një shumë e vogël EGFR apo EGFR inaktiv u imobilizua në biosensor. Në sipërfaqen aktive të përfutur nga imobilizimi i EGFR nga lizati qelizor në tamponin RIPA mbi antitropin kundër EGFR të Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), u vrojtuan nivele shumë të ulëta bashkëveprimi me EGF. U regjistrua një nivel maksimal prej 5 RU dhe kjo vetëm për përqendrime të EGF 20-160 nM (Figura 2), duke treguar se sasia e EGFR të imobilizuar në sipërfaqen e biosensorit ishte tepër e ulët. Të gjitha sensogramet e paraqitura u korrektuan me sinjalet e përfutura nga sipërfaqet e referimit dhe injeksionit të tamponit rrjedhës.



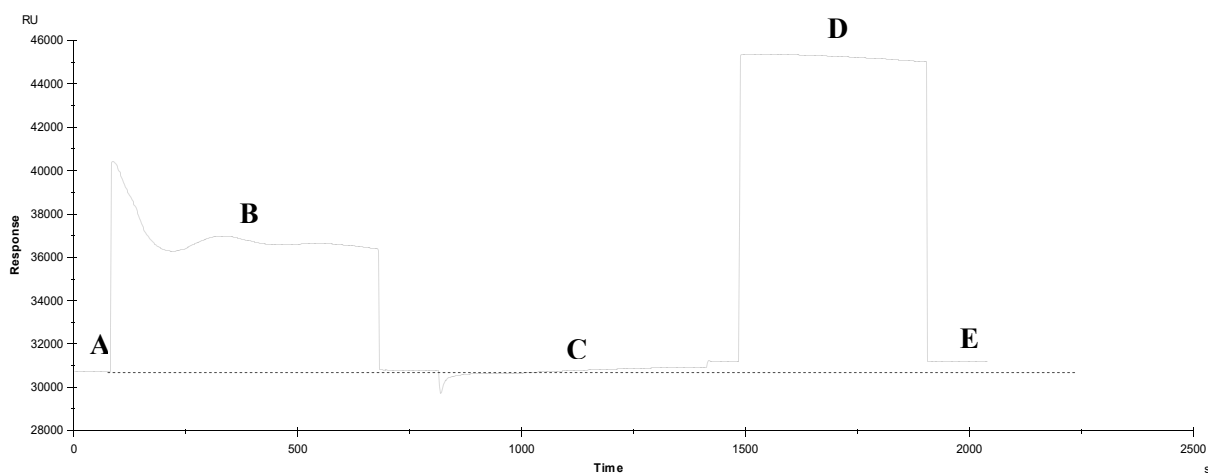
**Figura 1:** Bashkëveprimi i EGF me sipërfaqet aktive të përfutura nga përdorimi i lizateve qelizore në tamponin PBS si burim EGFR dhe antitropave kundër EGFR **a)** abcam plc (Cambridge, UK) dhe **b)** Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) për imobilizimin e receptorit.



**Figura 2:** Bashkëveprimi i EGF me sipërfaqet aktive të përfutura nga përdorimi i lizateve qelizore në tamponin RIPA si burim EGFR dhe antitropave kundër EGFR **a)** abcam plc (Cambridge, UK) dhe **b)** Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) për imobilizimin e receptorit. Vetëm një sinjal 5 RU (jo në përputhje me përqendrimin rritës të EGF) u regjistrua në rastin e përdorimit të antitropit kundër EGFR të Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

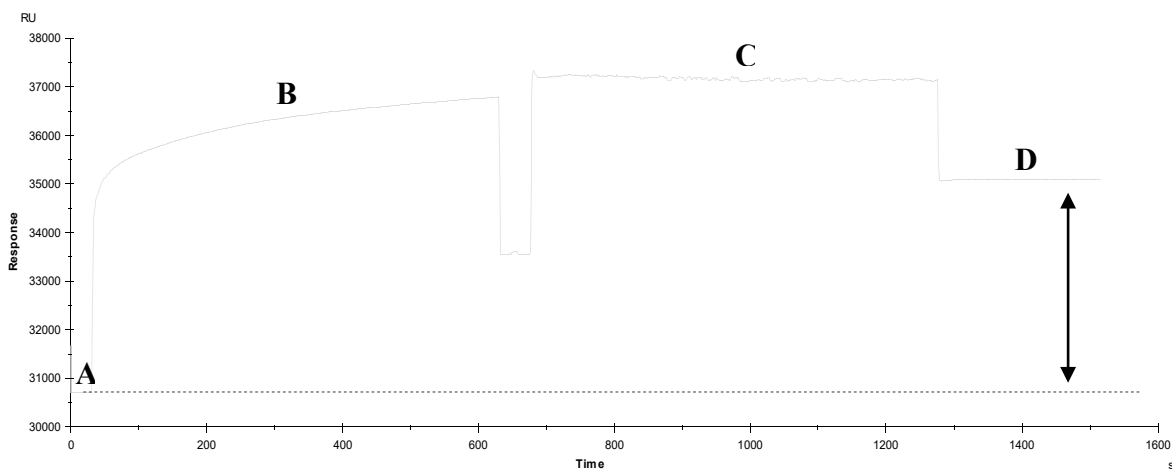
## 2. Bashkëveprimi i EGFR me EGF e imobilizuar

Për të studiuar bashkëveprimin e kompleksit EGF/EGFR edhe EGF u përdor si mjet për imobilizimin e EGFR mbi sipërfaqen e biosensorit L1. EGF u imobilizua nëpërmjet reaksionit të lidhjes aminike dhe më pas u ekzaminua bashkëveprimi i tij me dy lizate të ndryshme qelizash A431 (burim i EGFR). EGF u solubilizua në acetat natriumi 10 mM, pH 4.5 dhe një solucion 100 µg/mL u injektua mbi biosensorin për 10 min me fluks 5 µL/min duke rezultuar në 800 RU sikurse tregohet në figurën 3. Niveli i bashkëveprimit të lizateve qelizore të qelizave A431 në tamponët A apo B (përshkruar më parë) rezultoi më i lartë në sipërfaqet e referimit (ku nuk ishte imobilizuar EGF) krahasuar me sipërfaqet aktive, përkatësisht 4375 RU kundrejt 2180 RU për lizatet në tamponin A dhe 2462 RU kundrejt 1528 RU për lizatet në tamponin B. Sikurse tregohet në figurën 4, një bashkëveprim jo specifik me sipërfaqen e biosensorit u regjistrua për të dyja lizatet qelizore të përdorura.

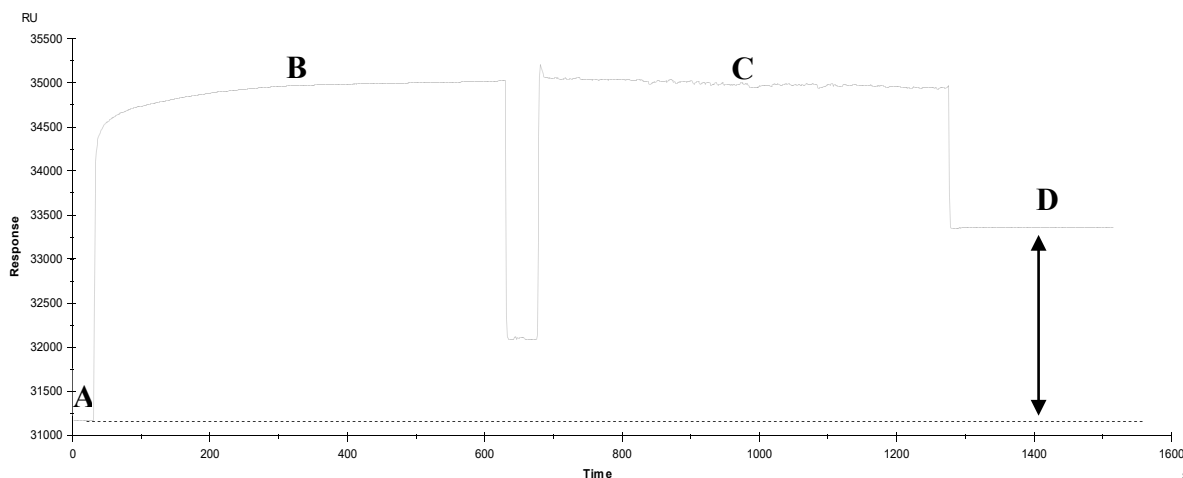


**Figura 3:** Lidhja aminike e EGF në *chip-in* L1. **A)** Niveli bazë. **B)** Aktivizimi i sipërfaqes së biosensorit 0.4 M EDC/0.1 M NHS për 7 min. **C)** Bashkëveprimi i 100 µg/mL EGF në 10 mM acetat natriumi, pH 4.5 injektuar për 10 min. **D)** Inaktivizimi i sipërfaqes së sensorit me etanolaminë 1 M për 7 min. **E)** Sasia e imobilizuar e EGF (E-A).

a)



b)



**Figura 4:** Sensogramet përfaqësuese të sipërfaqes së referimit **a)** dhe asaj aktive **b)** që tregojnë bashkëveprimin e lizateve qelizore të A431 me EGF të imobilizuar në *chip*-in L1. **A)** Niveli bazë. **B)** Injektimi i lizatit qelizor. **C)** Injektimi i tretësirës lipidike. **D)** Niveli i bashkëveprimit (**D-A**).

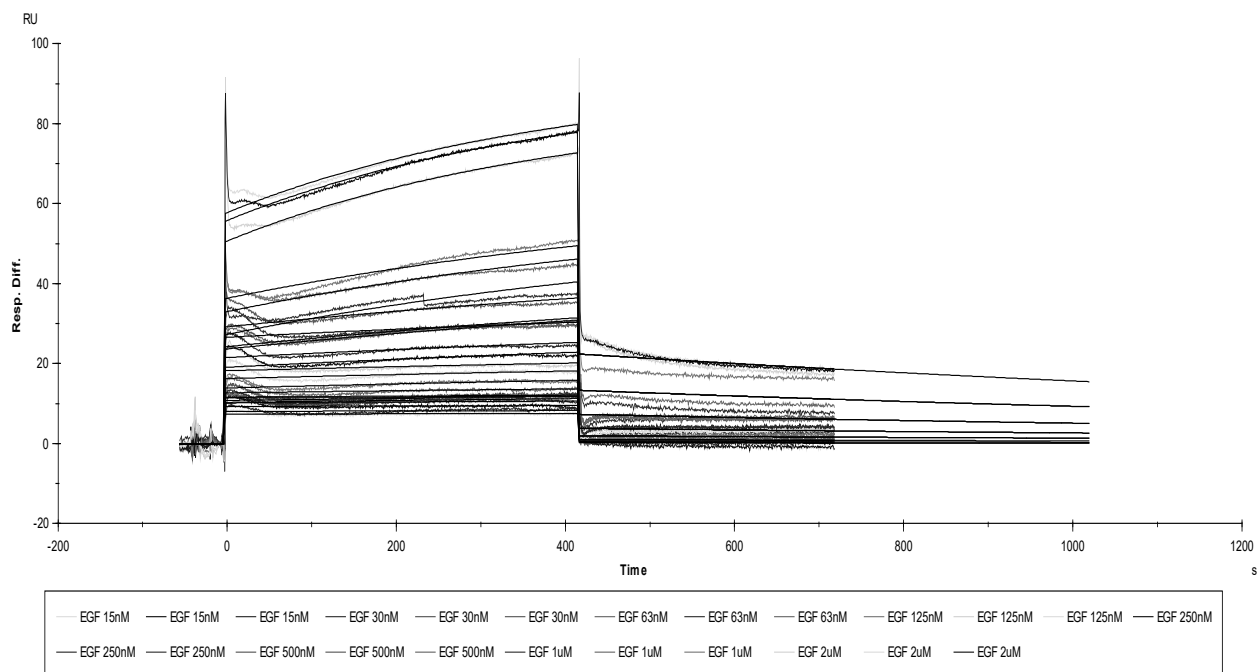
### 3. Bashkëveprimi i EGF me EGFR e purifikuar të imobilizuar nëpërmjet çiftimit aminik

Forma komerciale e EGFR të purifikuar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) u imobilizua mbi *chip*-in L1 nëpërmjet reaksionit të lidhjes aminike, duke rezultuar në 3500 RU.

Sipërfaqet aktive dhe të referimit (kontroll negativ) u ekuilibruan me injektimin e katër cikleve të njëpasnjëshme të tamponit rrjedhës për 7 min me fluks 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Përqendrime rritëse të EGF u injektuan më pas me të njëjtat parametra në të dyja sipërfaqet e biosensorit. Një sinjal i konsiderueshëm bashkëveprimi u regjistrua nga sensogramet e korrektuara me kontrollet (Figura 5). Bashkëveprimi i EGF me EGFR rezultoi të ishte i varur nga përqendrimi. EGF u lejua të vetëshkëputej nga sipërfaqja për 5 min përpara se të procedohej me rigjenerimin e biosensorit.

Parametrat kinetikë të bashkëveprimit ( $k_a = 1.18 \pm 0.28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ), si dhe ata të disocimit ( $k_d = 4.24 \pm 0.31 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ) u llogaritën duke përdorur *software*-in BIAevaluation 4.1 dhe vlera e përfutur e  $K_D$  ( $368 \pm 0.65 \text{ nM}$ ) për një model të supozuar bashkëveprimi të llojit Langmuir 1:1, rezultoi e krahasueshme me atë të raportuar në literaturë për bashkëveprimin e EGF me domenin jashtëqelizor të EGFR [2]. Natyra me të cilën paraqiten sensogramet e përfutur tregon se bashkëveprimi i EGF me receptorin me shumë probabilitet shkakton shfaqjen e dukurive të tjera, siç mund të jenë ndryshimet e konformacionit të vetë receptorit, të cilat ndërhyjnë në procesin e formimit të kompleksit EGF/EGFR.



**Figura 5:** Përshtatja e kurbave të bashkëveprimit të EGF me EGFR e imobilizuar nëpërmjet lidhjes aminike falë *software*-it BIAevaluation 4.1. Katër cikle të njëpasnjëshme tamponi rrjedhës u injektuan mbi biosensor të ndjekura nga injeksione, në përqëndrim rritës dhe në triplikatë të EGF, për 7 min me fluks 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Disocimi (vetëshkëputja) i EGF u lejua për 5 min përpara rigjenerimit të biosensorit për 1 min, me glicinë 10 mM, pH 2.0.

## Diskutim

Përftimi i njohurive të përditësuara mbi mekanizmat molekularë që qëndrojnë në themelet e biologjisë së tumoreve, ka sjellë si rezultat të menjëhershëm zhvillimin e një numri të lartë biomolekulash të afta të shnjestojnë specifikisht EGFR, të cilat shfaqin një selektivitet të theksuar kundrejt qelizave canceroze [23]. Në këtë kuadër, analiza e mekanizmit të bashkëveprimit molekular midis EGF dhe EGFR, rezultoi të jetë tejet e rëndësishme në optikën e përfuturit të njohurive të përgjithshme që mund të luajnë një rol thelbësor në procesin e projektimit të barnave të reja të cilat kanë për qëllim modifikimin e aftësisë bashkëvepruese të EGFR me ligandët e tij.

Tre qasje të ndryshme eksperimentale u testuan me qëllim krijimin e një modeli eksperimental të përshtatshëm për analizën e bashkëveprimit të kompleksit EGF/EGFR nëpërmjet teknikës SPR. Në plan të parë, u synua të krijohet një teknikë e cila do të mundësonte analizën e këtij bashkëveprimi duke përdorur si burim të receptorit, vetë qelizat tumorale. Prandaj, u procedua pikësisht, duke imobilizuar receptorin nga lizati total i qelizave A431, të njohura për sasinë e madhe të EGFR të shprehur në to. Në fakt, në mënyrë që të sigurohet një orientim i përshtatshëm i receptorit mbi sipërfaqen e biosensorit, u përdorën dy antitropa të ndryshëm kundër EGFR, të cilët do të siguronin imobilizimin e tij mbi sensor duke lënë të lirë domenin aminik (domenin lidhës të EGF). Njëkohësisht, u procedua me krijimin e një ambienti sa më të përafërt me ambientin natyral të receptorit duke rikrijuar në sipërfaqen e sensorit një bishtresë lipidike (OSR), falë injektimit të një tretësire lipidesh. EGF u imobilizua në sipërfaqen e biosensorit për të analizuar bashkëveprimin e tij të drejtpërdrejtë me receptorin e gjendur në lizatet totale të qelizave A431. Përsëri u procedua me rikrijimin e bishtresës lipidike mbi sipërfaqen e biosensorit. Gjithsesi, të dyja këto projekte

eksperimentale, që synonin krijimin e një ambienti natyral për receptorin dhe përdorimin e një numri sa më të ulët procedurash eksperimentale për izolimin e tij, për të modifikuar sa më pak të ishte e mundur gjendjen natyrale të receptorit, rezultuan në praktikë me rezultate jo të kënaqshme. Imobilizimi i EGFR nuk rezultoi efikas duke pasur parasysh faktin se SPR është një teknikë shumë e ndjeshme ndaj ndryshimeve të masës së biomolekulave të gjendura në sipërfaqen e biosensorit dhe kompleksiteti i lartë (sasia e madhe e biomolekulave të pranishme) i lizateve totale të qelizave A431 të përdorura në eksperimente mund të ketë ndikuar negativisht mbi aftësinë matëse të biosensorit. Edhe në rastin kur EGF u imobilizua mbi biosensor për të analizuar bashkëveprimin e tij me EGFR të pranishëm në lizatet e qelizave A431, u përfutuan rezultate jo të kënaqshme duke sugjeruar kështu se një purifikim paraprak i EGFR ishte i nevojshëm për të proceduar me analizën e bashkëveprimit të kompleksit EGF/EGFR në SPR. Një formë komerciale e purifikuar e receptorit të EGF u imobilizua në biosensor duke rezultuar në 3500 RU. Përqendrimet rritëse të EGF të injektuara mbi receptorin e imobilizuar treguan se EGFR ishte në gjendje të bashkëvepronte me EGF me një vlerë të llogaritur të  $K_D = 368 \pm 0.65$  nM, duke supozuar se bashkëveprimi EGF/EGFR ndjek modelin e Langmuir 1:1. Duke pasur parasysh relacionin e kundërt që ekziston mes  $K_D$  dhe afinitetit, ky model eksperimental është i përshtatshëm për *screening*-un e molekulave të reja që shenjestrojnë EGFR dhe që shfaqin një afinitet më të lartë për receptorin krahasuar me EGF me qëllim identifikimin e molekulave të reja të afta të bllokojnë bashkëveprimin e EGFR me EGF.

## Përfundime

Nëpërmjet këtij studimi u synua të krijohej një metodë e re për të matur në mënyrë specifike bashkëveprimin e EGFR me ligandin e tij natyral, EGF. Specifikisht, u përzgjedh për këtë studim *Biosensor Surface Plasmon Resonance* e njohur si teknikë që mundëson matjen e bashkëveprimeve biomolekulare në kohë reale dhe në mënyrë të drejtpërdrejtë, pa nevojën e përdorimit të molekulave gjurmuese të cilat mund të ndikojnë negativisht në bashkëveprimin EGF/EGFR duke krijuar artefakte. Rezultatet e përfutura lidhur me bashkëveprimin e EGFR me EGF tregojnë se metoda e zhvilluar për matjen e bashkëveprimit në SPR paraqet specificitet të lartë dhe është njëkohësisht e shpejtë dhe e thjeshtë për t'u riprodhuar. Kjo metodë, gjithashtu, përcakton një pikë referimi shumë të dobishme për studime të mëtejshme të cilat kanë për qëllim krijimin e barnave të reja antitumorale, të projektuara për të ndërhyrë në bashkëveprimin e receptorit me EGF duke e bllokuar atë. Në këtë kuadër, krahasimi i aftësisë lidhëse për EGFR, mes molekulave të ndryshme natyrale apo të sintetizuara dhe EGF, paraqitet si një test i shpejtë i tipit *screening* që do të lehtësojë seleksionimin në kohë reale të molekulave më premtuese, atyre që bashkëveprojnë me receptorin duke spostuar kështu EGF. Metoda e paraqitur në këtë studim hedh një hap të rëndësishëm në avancimin e studimeve në fushën e farmakologjisë, dhe në veçanti atë të zhvillimit të antitumoralëve që synojnë shenjestrimin specifik të receptorit të EGF.

## Referenca

1. Yoshimoto, Y. and Imoto, M. Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. *Experimental Cell Research* 2002; 279; 118–27.
2. Zhou, M., Felder, S., Rubinstein, M., Hurwitz, D.R., Ullrich, A., Lax, I., Schlessinger, J. Real-Time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry* 1993; 32; 8193-8.
3. Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2; 127-37.
4. Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100; 57–70.
5. Yarden, Y., The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 4; S3–8.
6. Nyati, M.K., Morgan, M.A., Feng, F.Y., Lawrence, T.S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;

- 6; 876–85.
7. Meyerhardt, J.A., Kwok, A., Ratain, M.J., McGovren, J.P., Fuchs, C.S. Relationship of baseline serum bilirubin to efficacy and toxicity of single-agent irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22; 1439–46.
  8. Mackenzie, M.J., Hirte, H.W., Glenwood, G., et al. A phase II trial of ZD1839 (Iressa) 750 mg per day, an oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2005; 23; 165–70.
  9. Townsley, C.A., Major, P., Siu, L.L., et al. Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*; 2006; 94; 1136–43.
  10. Bardelli, A., Siena, S. Molecular Mechanisms of Resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28; 1254–61.
  11. Shankaran, V., Obel, J., Benson, A.B. 3rd. Predicting Response to EGFR Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer: Current Practice and Future Directions. *Oncologist* 2010; 15; 157–67.
  12. Capdevila, J., Elez, E., Macarulla, T., et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 2009; 35; 354–63.
  13. Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors Actuators* 1983; 4; 299–304.
  14. Fägerstam, L.G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B., Rönnberg, I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* 1992; 597; 397–410.
  15. Myszka, D.G., Jonsen, M.D., Graves, B.J. Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Anal Biochem* 1998; 265; 326–30.
  16. Wilson, W.D. Analyzing biomolecular interactions. *Science* 2002; 295; 2103–5.
  17. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1; 515–28.
  18. Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., Cohen, S. Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75; 3317–21.
  19. Yoshimoto, Y. and Imoto, M. Induction of EGF-Dependent Apoptosis by Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase Inhibitors in A431 Cells Overexpressing the EGF Receptor. *Experimental Cell Research* 2002; 279; 118–27.
  20. Varkondi, E., Schäfer, E., Bökönyi, G., et al. Comparison of ELISA-based tyrosine kinase assays for screening EGFR inhibitors. *Journal of Receptors and Signal Transduction Res* 2005; 25; 45–56.
  21. Nice, E., Lackmann, M., Smyth, F., Fabri, L., Burgess, A.W. Synergies between micropreparative high-performance liquid chromatography and an instrumental optical biosensor. *J Chromatogr A* 1994; 660; 69–85.
  22. Stenlund, P., Babcock, G., Sodroski, J., Myszka, D. Capture and Reconstitution of G-protein Coupled Receptors on a Biosensor Surface. *Analytical Biochemistry* 2003; 316; 243–50.
  23. Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2; 127–137.