

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Tóth Gábor

HER2 pozitív tumorok kombinált antitest terápiája

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

HER2 pozitív tumorok kombinált antitest terápiája

Dr. Tóth Gábor

Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

TÁRGYSZAVAK

HER2, trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab-rezisztencia, antitest-függő sejtes citotoxicitás (ADCC), kombinált antitest terápia, nem radioaktív *in vitro* ADCC mérési módszerek, impedancia alapú sejtanalizátor

KEY WORDS

HER2, trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab resistance, Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC), combination antibody therapy non-radioactive ADCC assays, impedance-based cell analyzer

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
BEVEZETÉS	2
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
DAGANATELLENES IMMUNTERÁPIÁS MÓDSZEREK, OSZTÁLYOZÁSOK.....	4
AZ ANTITESTEK (IGG) ÁLTALÁNOS FELÉPÍTÉSE	6
AZ ANTITESTFÜGGŐ SEJTES CITOTOXICITÁS (ADCC)	7
AZ ADCC KVANTITATÍV VIZSGÁLATÁRA HASZNÁLT MÓDSZEREK.....	8
Membrán permeabilitáson alapuló mérések.....	9
Az ADCC-re specifikus kaspáz reakciók kvantitálása.....	9
Impedancia alapú sejtanalízis	9
A HER ONKOPROTEIN CSALÁD	10
A HER fehérjék jelátviteli mechanizmusa	11
HER2 MINT ONKOPROTEIN	13
HER2 MINT TERÁPIÁS CÉLPONT	14
Trastuzumab (Herceptin®)	14
Pertuzumab (Perjeta®).....	15
ANTITESTEK ALKALMAZÁSA KOMBINÁCIÓBAN.....	15
CÉLKITŰZÉSEK	18
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
ÁLTALÁNOS TÖRZSOLDATOK ÉS ANYAGOK	19
IMMUNFLUORESCENCIÁS JELÖLÉSHEZ	20
SDS GÉL ELEKTROFORÉZIS	21
F(AB') ₂ PREPARÁLÁS	21
<i>IN VITRO</i> ADCC KÍSÉRLETEK	22
<i>IN VIVO</i> XENOGRAFT KÍSÉRLETEK	22
SEJTTENYÉSZTŐ KAMRÁK.....	22
SEJTVONALAK ÉS TENYÉSZTÉSÜK	23
ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS VIZSGÁLATOK.....	24
ANTITEST F(AB') ₂ FRAGMENTUMOK KÉSZÍTÉSE.....	25
ANTITESTEK KONJUGÁLÁSA FLUORESCENS FESTÉKKEL.....	26
HER2-KÖTÉS AFFINITÁS VIZSGÁLATA.....	26
FC FRAGMENTUM HIÁNYÁNAK VIZSGÁLATA INDIREKT JELÖLÉSSEL	27
<i>IN VITRO</i> SEJTPROLIFERÁCIÓ VIZSGÁLATA	27
FÖRSTER (FLUORESCENCIA) REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER (FRET).....	28
<i>IN VITRO</i> ADCC VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	29
FDA és CFSE jelölés	29
FDA és CFSE spontán felszabadulásának vizsgálata.....	29
CFSE- és PI-alapú áramlási citometriás ADCC mérés	30
PanToxiLux teszt	31
Impedancia alapú sejtanalizátor.....	32
<i>IN VITRO</i> ADCC IMMUNSZINAPSZIS-KÉPZŐDÉS VIZSGÁLATA	34

XENOGRFT TUMOROK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATA <i>SCID</i> EGÉRBEN	34
TUMOR XENOGRFT METSZETEK ÉS IMMUNFLUORESZCENS JELÖLÉSÜK.....	35
KONFOKÁLIS LÉZER PÁSZTÁZÓ MIKROSKÓPIA	36
STATISZTIKAI ADATELEMZÉS	37
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	38
I. RADIOAKTIVITÁS-MENTES, KITAPADÓ CÉLSEJTEK VIZSGÁLATÁHOZ OPTIMALIZÁLT, <i>IN VITRO</i> ADCC MÉRÉSI MÓDSZER KIVÁLASZTÁSA	38
I.1. Fluoreszcens festék felszabadulásán alapuló <i>in vitro</i> ADCC módszer	38
I.2. Áramlási citometriás ADCC mérés CFSE és propidium jodid alkalmazásával	40
I.3. ADCC vizsgálata a specifikusan ADCC által kiváltott intracelluláris folyamatok detektálásával.....	41
I.4. Sejtadhézió impedancia-alapú mérése ADCC valós idejű követésére	44
I.5. NK alapaktivitás PI/CFSE, PanToxiLux és impedancia-alapú mérések során.....	46
II. ANTI-HER2 ANTITESTEK HATÁSMECHANIZMUSÁNAK ÉS HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA	47
F(ab') ₂ fragmentumok előállítása	47
<i>In vitro</i> proliferációs vizsgálatok	53
HER2 heterodimerizáció vizsgálata FRET-tel.....	54
A kombinált antitest kezelés hatása az <i>in vitro</i> sejtproliferációra.....	55
Az <i>in vivo</i> daganatellenes hatás vizsgálata.....	57
<i>Ex vivo</i> szövettani analízis.....	59
Az <i>in vitro</i> ADCC vizsgálata.....	61
KÖVETKEZTETÉSEK	63
ÖSSZEFOGLALÁS	70
SUMMARY	71
IRODALOMJEGYZÉK	72
HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	72
HIVATKOZOTT ÉS EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	80
AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYSZERZŐS TDK ELŐADÁSOK, PÁLYAMUNKÁK	82
Helyi TDK előadások.....	82
Országos TDK előadások.....	82
TDK pályamunkák	82
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI .	85

Rövidítések jegyzéke

ADCC	antitest-függő sejtes citotoxicitás
CFSE	karboxifluorescein diacetát szikcimidil észter
DAPI	diamino-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EC ₅₀	50%-os aktivitáshoz szükséges koncentráció
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (HER1, EGFR)
ELISA	enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat
ErbB	Eritroblasztos leukémia B receptor tirozinkináz család
F(ab') ₂	bivalens antitest fragmentum, Fc rész nélkül
FCS	fötális borjú szérum
FDA	fluorescein diacetát
FITC	fluorescein-izotiocianát
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav oldat
HER2, ErbB2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HER3	humán epidermális növekedési faktor receptor 3
IgG	Immunglobulin G antitest
IP ₃	inozitol (1,4,5)-triszfoszfát
i.v.	intravénás
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MTT	dimetil tiazolil difeniltetrazólum só
NK-sejt	természetes ölósejt
PI	propidium-jodid
RasGAP	Ras GTPáz aktivátor protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
s.c.	szubkután
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (súlyos kombinált immunhiányos betegség)
FRET	Förster Rezonancia Energia Transzfer

Bevezetés

Az elmúlt évtizedben és napjainkban a daganatellenes terápiás kutatások és fejlesztések egyik legnagyobb reménye a daganatellenes immunterápia. Az onkológiai terápiás protokollok az elmúlt évtizedben az általános citotoxikus hatásmechanizmusú kemoterápiától és sugárkezeléstől a daganat-specifikus kezelés irányába mozdultak. 2013-ban a Science magazin a daganatellenes immunterápiát „Az év áttörése” („Breakthrough of the Year”) címmel illette, mindazonáltal az immunterápiás eredmények nem egy év, hanem hosszú, folyamatos munka gyümölcsei, és a kutatási terület jelenleg népszerűbb, mint valaha, melynek eredményeképp újabb, eddigiekhez képest markánsan új módszerekben és újabb – daganatos és immunológiai betegségek elleni – sikeres terápiákban bizakodhatunk. A „személyre-szabott orvoslás” körbe tartozó, klinikai felhasználásra engedélyezett daganat-specifikus kezelések alapját és zömét jelenleg az antitest alapú kezelések adják.

A legfrissebb klinikai protokollokat és azok fejlődését és fejlesztését is szem előtt tartva kutatómunkám középpontjában a HER2-t kifejező daganatok célzott antitest terápiás lehetőségeinek és a terápiák hatásmechanizmusainak feltérképezése áll.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a HER2 ellen létrehozott trastuzumab (Herceptin®) és pertuzumab (Perjeta®) monoklonális antitestek hatását HER2-t kifejező, de biológiailag eltérően viselkedő daganatokon, és vizsgáltuk a két antitest kombinált alkalmazásának előnyeit, a lehetséges terápiás konzekvenciákat szem előtt tartva. A feltett kérdések megválaszolásához kísérleti rendszereink fejlesztése és optimalizálása is szükséges volt, ennek során olyan, radioaktív eljárásoktól mentes *in vitro* antitest-függő sejtes citotoxicitást vizsgáló módszert dolgoztunk ki, mely nem csak a disszertáció részét képező eredményekhez és munkacsoportunk jövőbeli kutatásához szükséges, hanem általában ajánlható immunterápiás kutatásokhoz, mint biztonságos, standardizálható *in vitro* vizsgálati módszer.

Irodalmi áttekintés

A daganatellenes immunterápiás kutatás évekig csupán kevés számú kutató és kutatólaboratórium fókuszterülete volt. Az 1980-as évektől kezdve a tumor genetika és sejtbiológia felfedezéseiből lendületet kapott a daganatterápia fejlődése, ugyanis a daganatok kialakulásáért és progressziójáért felelős biológiai útvonalak megértése specifikus kulcspontokat is feltárt, melyek specifikus daganatellenes terápiák célpontjai lehettek. A specifikus daganatterápia célja ezen targeteken keresztül „támadva” a daganatos sejtet annak életképességének, proliferációjának gátlása, végső soron a daganat *in situ* elölése, miközben a környező, ép szöveteket nem éri károsító hatás. A célzott daganatellenes immunterápia fő hatásmechanizmusai között a daganatos sejtek „megjelölése” is megtalálható a beteg saját immunrendszere számára, valamint a beteg immunrendszerének segítése, aktiválása a daganat felismeréséhez és elpusztításához.

Az elmúlt 10 évben az immunterápia egyértelműen az egyik leggyorsabban fejlődő, legnagyobb várakozással teli, legnépszerűbb daganatterápiás kutatási terület lett, 2013-ban a Science magazin ennek a területnek ítélte a rangos „Breakthrough of the Year” címét.

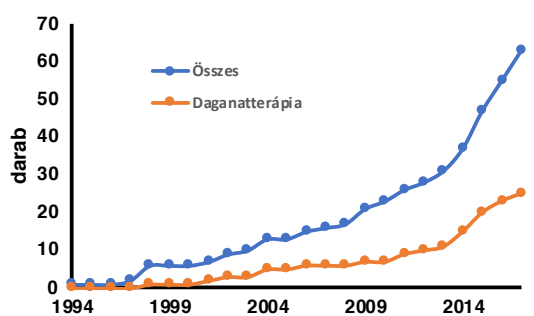
Az immunterápia célpontjai optimális esetben csak a daganatos sejteken/sejtekben találhatóak meg, de ez jellemzően ritkán valósulhat meg, lévén a daganat a gazdaszervezetből alakult ki, így azzal megegyező jellemzőkkel is bírhat. Szintén nehézséget jelent, hogy a daganat plasztikus természete miatt bár egy adott kezeléssel a daganatos sejtek többségét sikerül előlenni, egy kis számú sejtpopuláció megmarad(hat) és ez elegendő lehet a tumor kiújulásához, mely kiújult daganat már az eredeti túlélő sejtcsoport terápia-rezisztenciáját is hordozza. A daganatokra jellemző genetikai plaszticitás és a túlélési lehetőségek széles tárháza miatt bármilyen letális behatással szemben „kiszelektálódhat” egy megfelelő rezisztenciával bíró sejtpopuláció, még akár több szer kombinált alkalmazása esetén is. Ez az oka annak, miért olyan nehéz hosszútávon hatékony terápiát találni. A lehető legtöbb ilyen lehetőséget, módot fel kell tehát térképezni, és meg kell találni a szinergista mechanizmusokat, amelyekkel sikeres terápiás protokollokat tudunk felállítani, akár „daganatra” illetve személyre szabott módon.

Daganatellenes immunterápiás módszerek, osztályozások

A terápiás lehetőségeket jelenleg két fő osztályba sorolhatjuk (1). Az egyik, hogy a daganat helyett annak környezetét célozzuk, például a vérrellátás csökkentésével anti-angiogén terápiával, a másik, hogy a szervezet immunrendszerét mozgósítjuk a daganatsejtek ellen.

Az aktív immunterápia a szervezet immunrendszerét serkenti válaszra oly módon, hogy immunológiai memória alakul ki, ami miatt hosszú távú hatás érhető el, a terapia befejezése után is, bár a hatás a terapia elkezdésétől később várható. Aktív immunterápiába példaként a daganat vakcinákat és a sejtes immunterápiát sorolhatjuk. Ezzel szemben a passzív immunterápia az effektor mechanizmusokat felhasználva vált ki specifikus hatást, de nem hoz létre hosszútávú memóriát (a terapia végeztével a hatás elmúlik). Passzív immunterápiához sorolhatjuk a monoklonális antitesteket, a checkpoint inhibitorokat és citokineket.

A passzív immunterápiához tartozik a legkorábban és eddig legtöbb terápiás sikert hozó „adoptív transzfer”. Az adoptív transzfer olyan terápiát jelent, amikor egy specifikus immunválasz kiváltása érdekében az immunfolyamat egyik komponensét juttatjuk a szervezetbe, ezáltal közvetlenül effektor funkciót hozunk létre. A monoklonális antitestek sejtfelszíni antigéneket felismerve azokhoz kötődnek, és egyrészt tumorelles immunválaszt váltanak ki (antitestfüggő sejtes citotoxicitás, komplement mediálta citotoxicitás), másrészt blokkolhatják a felismert fehérje, például növekedési faktor receptor funkcióját, ezáltal közvetlen biológiai proliferáció-gátló hatást válthatnak ki. Az antitest terápiák korai sikerei egyre nagyobb érdeklődést és még több antitest kifejlesztését eredményezték, ezzel a klinikumban engedélyezett terápiás monoklonális antitestek száma exponenciálisan nőtt (1. ábra).



1. ábra. A FDA által klinikai terápiára engedélyezett monoklonális antitestek száma.
Adatok forrása www.fda.gov.

A daganatos betegségekben klinikai terápiában használt és engedélyezett monoklonális antitesteket, engedélyezésük sorrendjében, az 1. táblázat tartalmazza.

Generikus név	Gyári név	Dátum	Target molekula	Indikáció	Target sejttípus
Rituximab	Rituxan	1997	CD20	Non-Hodgkin limfóma	vérképzőszervi daganatsejt
Trastuzumab	Herceptin	1998	HER2	Emlőrák	szolid tumor daganatsejt
Alemtuzumab	Campath	2001	CD52	Krónikus limfocitás leukémia	vérképzőszervi daganatsejt
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	2002	CD20	Non-Hodgkin limfóma	vérképzőszervi daganatsejt
Tositumomab	Bexxar	2003	CD20	Non-Hodgkin limfóma	vérképzőszervi daganatsejt
Bevacizumab	Avastin	2004	VEGF	Colorektális, tüdő-, ováriumrák, glioblastoma multiforme	szolid tumor daganatsejt
Cetuximab	Erbitux	2004	EGFR (HER1)	Colorektális rák, fej-nyaki rákok	szolid tumor daganatsejt
Panitumumab	Vectibix	2006	EGFR (HER1)	Colorektális rák	szolid tumor daganatsejt
Ofatumumab	Arzerra	2009	CD20	Krónikus limfocitás leukémia	vérképzőszervi daganatsejt
Brentucimab vedotin	Adcetris	2011	CD30	Anaplasztikus nagy sejtes limfóma és Hodgkin limfóma	vérképzőszervi daganatsejt
Ipilimumab	Yervoy	2011	CTLA-4	Melanoma	checkpoint inhibitor
Pertuzumab	Perjeta	2013	HER2	Metasztatikus emlőrák	szolid tumor daganatsejt
Obinutuzumab	Gazyva	2013	CD20	Krónikus limfocitás leukémia	vérképzőszervi daganatsejt
Ramucirumab	Cyramza	2014	VEGFR2	Gyomorrák	szolid tumor daganatsejt
Blinatumomab	Blinicyto	2014	CD19	Prekurzor B-sejtes akut limfocitás leukémia	vérképzőszervi daganatsejt
Nivolumab	Opdivo	2014	PD-1	Melanoma, kissejtes tüdőrák	checkpoint inhibitor
Pembrolizumab	Keytruda	2014	PD-1	Melanoma, nem-kissejtes tüdőrák	checkpoint inhibitor
Dinutuximab	Unituxin	2015	GD2	Neuroblastoma	szolid tumor daganatsejt
Daratumumab	Darzalex	2015	CD38	Myeloma multiplex	szolid tumor daganatsejt
Necitumumab	Portrazza	2015	EGFR (HER1)	Metasztatikus laphámsejtes, nem-kissejtes tüdőcarcinoma	szolid tumor daganatsejt
Elotuzumab	Empliciti	2015	SLAMF7	Myeloma multiplex	vérképzőszervi daganatsejt
Atezolizumab	Tecentriq	2016	PD-L1	Urothelialis carcinoma	checkpoint inhibitor
Olaratumab	Lartruvo	2016	PDGFRA	Lágyrész sarcoma	szolid tumor daganatsejt
Avelumab	Bavencio	2017	PD-L1	Metasztatikus Merkel sejtes carcinoma	checkpoint inhibitor
Durvalumab	Imfinzi	2017	PD-L1	Urothelialis carcinoma	checkpoint inhibitor

1. táblázat A daganatterápiában engedélyezett monoklonális antitestek evolúciója példákon keresztül. A színek a célzott sejt típusa alapján, rózsaszín: vérképzőszervi daganat, zöld: szolid tumor daganatsejt, kék: checkpoint inhibitor (immunsejt). Adatok forrása: www.fda.gov.

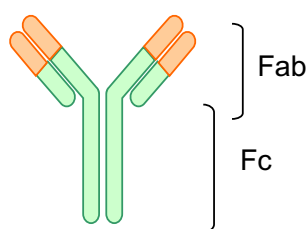
Az 1. táblázatból látható, hogy kezdetben dominánsan a vérképzősejtes daganatok ellen sikerült optimalizálni a monoklonális antitest terápiákat. A szolid tumorok természetüknél fogva zártabb „niche”-t képezve nehezebben hozzáférhetőek, így mind a monoklonális ellenanyag alapú, mind az aktív immunterápiákra jellemző, hogy az első sikereket vérképzőszervi daganatok ellen érték el, a szolid tumorok elleniek további fejlesztést, optimalizációt igényelnek.

Kiemelendő az 1. táblázatból, hogy kezdetben a daganatsejten található antigének voltak célpontban (CD20, HER2, CD53, EGFR, CD30), melyeken keresztül a daganatsejtek közvetlenül, molekuláris szinten befolyásolhatók és az immunsejtek számára a daganatsejtek „megjelölhetők”. Az ipilimumabbal viszont megjelentek az immunsejtek szabályozását befolyásoló antitestek. Az ipilimumab a CTLA-4 receptorhoz kötődve gátolja azt, mely receptor egyébként a citotoxikus T-sejtek élő aktivitását gátolná.

Hasonló elvet követ a pembrolizumab, mely a PD-1 (programmed cell death protein 1) „checkpoint” fehérjéhez kötődve annak T-sejt aktivációt gátló hatását hiusítja meg. (A PD-1 fehérjének egyébként fiziológiásan nagyon fontos szerepe van: autoimmun reakciók ellen véd)

Az antitestek (IgG) általános felépítése

A terápiában is használt antitestek általában az IgG alosztályba tartoznak. A teljes IgG antitestek (Wab, whole antibody) felépítésének leírása funkcionalitás és a strukturális megfontolások alapján is lehetséges és fontos (2).



2. ábra Az IgG antitestek felépítése

Felépítésüket tekintve három fő funkcionális részre oszthatóak (2. ábra). Két, egymással megegyező Fab („fragment antigen binding”) részből, melynek neve a funkciójára utal: antigén kötő N-terminális végével (paratóp) specifikusan felismeri a neki megfelelő antigén epitópot. A paratóp-epitóp specifikus felismerésért kb. 5 aminosavból álló szekvencia felelős, komplementer alak és töltés által. A harmadik alegység az Fc rész, melynek neve kristályosítható voltára utal („fragment crystallizable”), de funkciója más: az Fc fajspecifikus

rész különböző immunsejtek receptoraihoz és a komplement proteinekhez kapcsolódik, ennek következtében fejt ki hatását, pl. hízósejtek, basofil sejtek és eozinofil granulociták degranulációja, opszonizáció, és antitest mediálta sejtes citotoxicitáson keresztül sejtlízis.

A strukturális szempontok alapján az IgG két egyforma nehézláncból és két egyforma könnyűláncból áll, melyek összesen 6-8 konstans domént és négy variábilis domént tartalmaznak. Két variábilis domén alkot együttesen egy paratópot. A láncokat diszulfid hidak kötik össze.

A strukturális felépítés ismerete az antitest részekre bontásához szükséges. Papain enzimese emésztés az IgG molekulát két Fab és egy Fc fragmentre bontja, míg pepszines emésztéssel a kapocsrégió alatt tudjuk hasítani a molekulát, megkímélve a diszulfid hidakat, így a két Fab régió összekötve marad, és egy $F(ab')_2$ fragmentumot alkot, melyről az Fc rész levált. Az $F(ab')_2$ fragmentum jelölésében a 2-es index a bivalens felépítésre utal, a ' jel pedig arra, hogy az Fc rész „gyökénél” a diszulfid hidak magasságáig megmaradt láncrészrel a szigorúan vett Fab-tól némileg nagyobb fragmentumunk maradt.

Az antitestfüggő sejtes citotoxicitás

Az extracelluláris sejtpusztítás fontos effektor sejtjei közé tartoznak a természetes ölősejtek (Natural Killer, NK-sejt). Az érett NK-sejtek a keringéssel jutnak a perifériára, ahol kifejtetik sejtölő funkcióikat.

Az NK-sejtek sejtölési mechanizmusát az aktiváló és gátló jelek közötti arányok határozzák meg (3,4). A target felismerését követően gátló immunológiai szinapszis is kialakulhat, amely fontos a 'saját iránti tolerancia' kialakításában. A lítikus program beindulását elsősorban a gátló receptorokon (pl.: Killer Inhibitor Receptor – KIR) keresztül érkező negatívan szabályozó jelek akadályozzák meg, mely gátló receptorok az MHC-I-molekulákat ismerik fel, ezáltal az egészséges, MHC-I-molekulákat nagy számban hordozó saját sejtek védettek maradnak az NK-sejtekkel szemben.

Ezzel szemben az NK-sejtek aktiválásában fontos szerepet játszanak az immunglobulinok kötésére alkalmas $Fc\gamma RIII$ (CD16) molekulák, melyek az IgG-vel opszonizált sejtek (vírussal fertőzött vagy tumorossá fajult sejtek) megkötését és elpusztítását lehetővé teszik. Ezt a folyamatot nevezzük antitestfüggő sejtes citotoxicitásnak (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC). Az ADCC reakcióban tehát az MHC-I-molekuláknak és az NK egyéb receptorainak szerepe másodlagos, a citotoxikus reakciót a megfelelő ellenanyag-molekulákkal “megjelölt” célsejteknek az NK-sejttel való kölcsönhatása váltja ki.

Az ölösejt aktiválódási folyamata során intracelluláris kaszkádfolyamatok, membránbeli mozgások, valamint a citoskeleton átrendeződésének eredményeként az intracelluláris granulumok az immunológiai szinapszis (a célsejt és ölösejt érintkezési felszínei) felé csoportosulnak. A granulumok tartalma exocitózissal kiürül, mely tartalom egyik fő eleme a perforin. A perforin a granulumokban az alacsony pH-nak és alacsony Ca^{2+} koncentrációnak köszönhetően inaktív, monomer formában van jelen. Az extracelluláris térbe ürülve a magasabb pH és Ca^{2+} koncentráció hatására kötődik a célsejt membránjához, és oligomerizálódással 10–20 nm átmérőjű pórusokat formálva kilyukasztja azt. A pórusokon keresztül a granulumok egyéb enzimejei (pl. granzim B) a célsejtbe jutnak, és sejthalálhoz vezető kaszpáz útvonalakat aktiválnak. A célsejt membránjában keletkezett pórusok egyúttal átjárhatóvá teszik a membránt az ionok és a víz számára, aminek eredménye a sejt lízise (duzzadás és szétesés). A célsejt membránjának kilyukasztását és a kaszpáz kaszkád aktiválását, mely a célsejt halálával zárul, „halálos csapás”-nak (lethal hit) nevezzük (5).

Az NK-sejtek funkciója fontos eleme a tumorokkal és egyes vírusfertőzésekkel szembeni immunitásnak (6). Az NK-sejtek hiánya vagy funkcionális defektusa esetén a ferőzések és daganatok fokozott gyakorisággal fordulnak elő (7).

Az ADCC kvantitatív vizsgálatára használt módszerek

Daganatellenes immunterápiás kutatásunk számára olyan módszerre volt szükség, amellyel az immunrendszer komplex működését *in vitro* modellezve kvantitatív, reprodukálható és standardizálható módon vizsgálhattuk a kitapadó célsejtek elleni antitest-függő sejtes citotoxist oly módon, hogy az annak hatékonyságában bekövetkező kismértékű változást is kimutathassuk. A ^{51}Cr felszabadulás mérése a citotoxicitási tesztek legrégebben, széles körben elfogadott módja. Ugyanakkor, mivel a módszer radioaktív anyagok használatát igényli, ami komoly egészségügyi kockázatokkal jár, az irodalomban is észlelhetően jelentős az igény radioaktivitástól mentes módszerekre (8,9).

Mindezek okán elsőként azt tűztük ki célul, hogy szisztematikus vizsgálattal kiválasszuk azt, vagy azokat a letapadó target sejtek esetén alkalmazható radioaktivitás-mentes technikákat, melyek kismértékű változás detektálására is képesek. A kismértékű változások észlelése érdekében elvárásunk volt, ahol a kísérleti rendszer a lehető legkisebb mértékben befolyásolja az ADCC folyamatát és az abban részt vevő sejteket. Ennek megfelelően az irodalomban megtalálható komplex technikákat (pl. TAG-Lite Assay, ADCC Reporter Bioassay (10)) nem vizsgáltuk.

Membrán permeabilitáson alapuló mérések

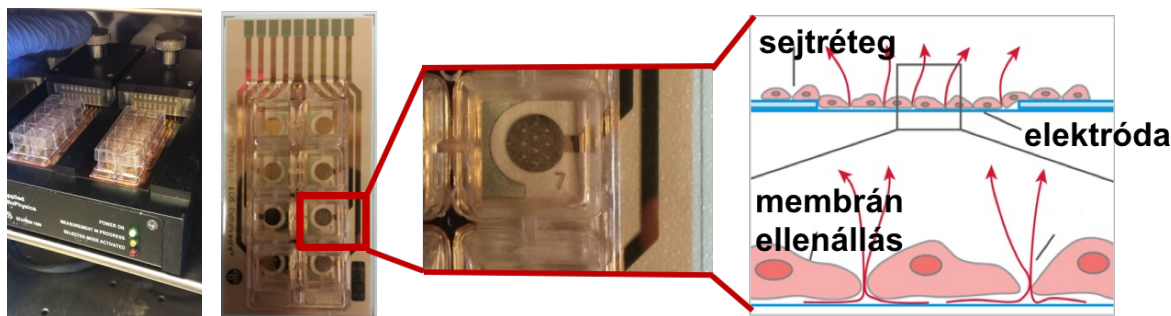
A felszabaduláson alapuló (release) tesztek, köztük a klasszikus radioaktív króm felszabadulás teszt lényege, hogy a célsejtben természetesen megtalálható, vagy abba kívülről bejuttatott anyag kiáramlásának mértékét mérik, és ebből következtetnek a sejt pusztulására. A ^{51}Cr radioaktív króm izotóppal történő feltöltés helyett könnyen mérhető fluorofórokat is alkalmazhatunk erre a célra, de történtek próbálkozások a sejt saját enzimei, pl. a GAPDH mérésére is (11). Mivel a vizsgált anyag csak a megnövekedett aspecifikus permeabilitású célsejtekből szabadul fel, azaz a kezelés során elpusztult, károsodott célsejtekből, a felszabadult mennyiségből az *in vitro* ADCC kezelés hatékonyságára is lehet következtetni. Egyes szerzők (8) a felszabadulások vizsgálatoknál szenzitívebbnek írták le a propidium jodid (PI) felvétel áramlási citometriás mérését. A PI az aspecifikus membránpermeabilitás megnövekedése miatt bejut az elpusztult sejtek magjába, és a DNS bázispárjai közé interkalálódva fluoreszcencia intenzitása megnő.

Az ADCC-re specifikus kaszpáz reakciók kvantitálása

Az ADCC folyamatának egyik legfőbb effektív lépése, hogy az NK-sejtek granulumaiból felszabadult enzimek, köztük a granzim B, bejutnak a célsejtbe a szintén a granulumokból származó perforin által létrehozott pórusokon. A granzim B a célsejtben kaszpáz kaszkád folyamatot indít el, mely folyamat aktiválódása a célsejt pusztulásához hozzájárul. Ezzel szemben a sejtet ért aspecifikus stresszhatások miatti sejtelhalás során granzim B aktiváció nem detektálható, így fluoreszcens szubsztrátok segítségével az ADCC a kaszpáz aktiváció alapján mérhető.

Impedancia alapú sejtanalízis

Az impedancia alapú valós idejű sejtanalizáló rendszerek működési elve, hogy speciális sejttenyésztő kamra alján található mikroelektrodákon mérik váltakozó feszültség mellett az ellenállást és impedanciát (3. ábra). A sejttenyésztő edény aljára letapadt sejtek az áramköri jellemzőket megváltoztatják, a változásokból a letapadt sejtekről információkat nyerhetünk. Az alkalmazott feszültség olyan kicsi, hogy a sejtekre nincs hatással, ezáltal a mérés („mintavétel”) nem kell, hogy a kísérlet végpontját jelentse. A készüléket CO_2 inkubátorba helyezve a kísérlet során a célsejtek és ölüsejtek számára ideális körülményeket biztosíthatunk, így minimalizálva a sejteket ért stresszhatásokat.



3. ábra. Az ECIS Z0 impedancia alapú valós idejű sejtanalizáló készülék és mikroelektródás tenyésztőedény

A kamrák alján található mikroelektródák között mért ellenállás arányos a célsejtek által lefedett felülettel (letapadt sejtek számával, a sejtek kiterjedésével).

Az ECIS Z0 rendszer előnye, hogy az áramkör az ohmikus (R), kapacitív (C) és induktív (L) ellenállások értékét nyers adatként szolgáltatja, ráadásul a váltakozó feszültség frekvenciája 62,5 Hz és 64000 Hz között 11-osztásos logaritmikus skálán manuálisan állítható vagy akár mindegyik frekvenciával lemérhető az összes lyuk. A folyamatos mérés eredményeképp 8-lyukú kamra esetén mindegyik lyukról körülbelül 3 percenként rögzül 1 adatpont. A többrétű, nyers adatok nagyobb lehetőséget adnak a pontos elemzéshez. További anyagok, ágensek a kísérlet során bármikor a rendszerhez adhatók, a folyamatos monitorozás csak a kamra készülékből történő eltávolításának idejére szakad meg.

A mért impedancia függ az ionkoncentrációtól és – legfőként – a letapadó sejtek általi elektród-fedettségtől és a sejt-sejt kapcsolatoktól (12), ezáltal hasznosítható a proliferáció, életképesség és szétterülés (13), „sebgyógyulás” (wound healing) (14), citotoxicitás (15-17) vizsgálatához.

A HER onkoprotein család

A sejtproliferáció irányításában a sejt környezetében jelen lévő növekedési faktorok és az ezeket kötő receptorok központi szerepet játszanak. A HER (ErbB) családba tartozó transzmembrán glikoproteinek I. típusú receptor tirozin kinázok, melyek sokrétű jelátviteli útvonalakon keresztül fontos szerepet töltenek be a sejtnövekedés, sejt túlélés és differenciáció szabályozásában, és központi szerepet játszanak számos humán daganat patológiájában.

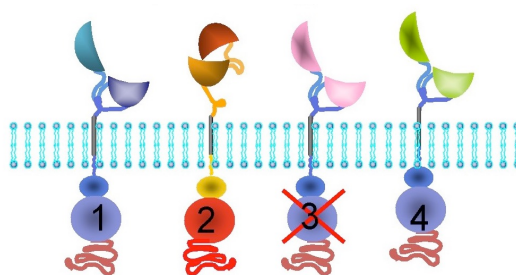
A család HER elnevezése az elsőként felfedezett tag nevéből, a humán epidermális növekedési faktor receptorból ered. Az ErbB elnevezés az virális erythroblastosis onkogén B-hez (v-ErbB) való hasonlóságból ered, mely retrovírus az arra érzékeny madarakban erythroleukémiát okoz (18).

A család négy tagját ismerjük, és azokat számokkal jelöljük (4. ábra).

Az elsőként felfedezett tag a humán epidermális növekedési faktor receptor (HER1, EGFR, ErbB1) szinte az összes szomatikus sejten megtalálható, ligandjai többek között az epidermális növekedési faktor (EGF) és a transzformáló növekedési faktor (TGF α).

A HER2-t (ErbB2) humán sejteken HER2-nek, rágcsálókon „Neu”-nak is nevezik (*neuronális* tumorban [glioblastomában] történt felfedezése miatt). A HER2-nek nincs természetes ligandja, állandóan aktív.

A HER3 (ErbB3) és HER4 (ErbB4) ligandjai pl. a neuregulinok (heregulinok). Közülük a HER3 kináz-deficiens, így jelátvitelt indítani önmagában nem, csak más HER családbeli fehérjékkel alkotott heterodimerjeiben tud (19).



4. ábra. A HER tirozin kináz család

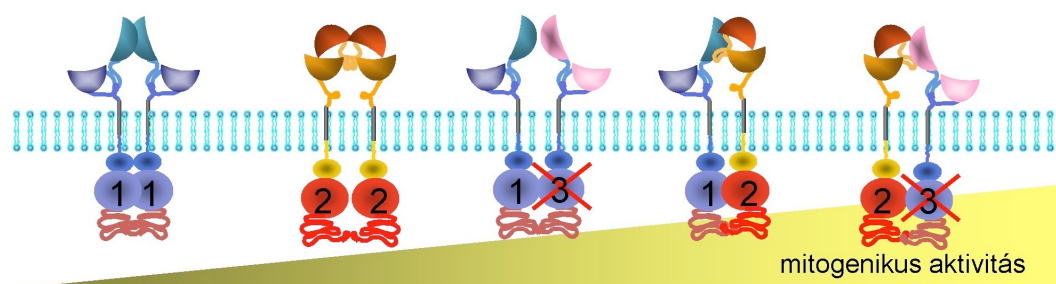
A HER fehérjék jelátviteli mechanizmusa

A receptor tirozin kinázok jelátvitelének jellegzetes és szükséges lépése a dimerizálódás. A receptorok aktív dimerizációs karján keresztül azonos receptorral (homodimerizálódás, pl. HER1-HER1) vagy a család egy másik tagjával (heterodimerizálódás, pl. HER1-HER2) kölcsönhatásba kerül. A dimer tagjai egymást foszforilálva létrehozzák a sejten belüli szignálok kiindulópontját (20,21).

Úgy vélik, az emlős sejtekben a HER család tagjainak számbeli növekedése funkcionális különbözőség, az egymástól való függőség igénye miatt történt, és nem pedig az egyedi receptoriális függetlenedés, kiváltképp nem a redundancia okán (22). Ezt alátámasztja, hogy a dimerek mitogenitása eltérő, azaz a dimerek kialakulásánál a partnerek „összetétele” meghatározza a jelátviteli aktivitást. A HER2-t tartalmazó dimerek rendelkeznek a legnagyobb mitogenikus aktivitással és a legmagasabb transzformációs potenciállal (5. ábra) (23), a család két, funkciójában sérül tagjának, az állandóan aktív, de ligand nélküli „süket”

HER2 és a kináz deficiens „néma” HER3 heterodimerje kiemelkedően mitogenikus potenciállal bír.

A HER2 autoaktivációja – homodimerizációja – expressziós szint függő lehet. A humán daganatokban a HER1-HER2 heterodimerizáció kiemelt jelentőségű, még akkor is, ha az *in vitro* mérések alapján nem ez a páros rendelkezik a legnagyobb mitogenitással.



5. ábra. A HER dimerek eltérő mitogenikus potenciálja

A mitogenikus aktivitás balról jobbra fokozódik. *In vitro* mérések alapján.

A receptorok felépítésére jellemző, hogy négy extracelluláris doménből állnak, melyek közül az I. III. és IV. domének a ligandkötésben játszanak szerepet. A II. domén a receptor dimerizációs karja. Ligand hiányában az EGFR extracelluláris doménje zárt formációt vesz fel, amikor is a II. domén β hajtókanyarja interakcióban van a IV. doménnel (24,25). Ligandkötés hatására a receptor nyitott konformációs állapotba kerül, II. doménjének hajtókanyarja kinyújtottá válik, a dimerizációs kar sztérikusan megközelíthetővé válik, így lehetővé válik a receptorok asszociációja egymással (26). A HER2 ligandkötő helye a struktúra belsejében van eltemetve (27), és dimerizációs karja mindig aktív, kinyújtott állapotban van (26,28). A HER2 a család többi tagjának preferált párképző partnere (29).

A foszforilált intracelluláris tirozin oldalláncok a downstream jelátvitelt facilitálандó kötőhelyként szolgálnak adapter molekulák és enzimek számára (20,30), például SH2 (SRC homology 2) vagy PTB (foszfortirozin kötő) domének számára. Az SH2 és PTB domént tartalmazó fehérjék legtöbbje saját enzimaktivitással és további fehérje modulokkal rendelkezik, melyek segítségével interakcióba kerülhetnek már fehérjékkel, foszfolipidekkel vagy nukleinsavakkal (31).

A receptor tirozin kinázok több szignálút vonal indításáért felelősek, melyek közül a daganat növekedése, és terápia-rezisztenciája szempontjából kettő kiemelt fontosságú:

A **Ras/MAPK** út vonal fontos szerepet tölt be a sejtciklusban, migrációban és differenciációban (32). A növekedési faktor receptor kötött fehérje 2 (Grb2) kötődik a receptor foszfortirozin reziduumaikhoz, ezután megköti az Sos fehérjét. Az Sos fehérje így a plazmamembránhoz közel kerül és a Ras guanin nukleotid kicserélő faktoraként (GEF) aktiválja azt. Az aktív Ras prominensen a MAPKK kinázokat (pl. Raf) aktiválja, melyek a MAPK (mitogén aktivált proteinkináz kináz) kinázokon keresztül (pl. MEK), MAP kinázokat (pl. ERK), aktiválnak, melyek MAP (mitogén aktivált protein) fehérjék foszforilációját végzik, ezáltal azok funkcióját szabályozva. A MAP fehérjék enzimek, receptorok, citoskeletonális fehérjék, ioncsatornák és nukleáris faktorok (33).

Az **Akt** szerin/treonin kináz szintén kulcsfontosságú szereppel bír a metabolizmus, növekedés, proliferáció, túlélés, transzkripció és fehérjeszintézis szabályozásában (34,35), proto-onkogénként tartják számon. Az Akt jelátviteli kaszkád aktiválódása a receptor tirozin kinázok felől a foszfatidil-inozitol-3 kináz (PI3K) és az általa termelt foszfatidil-inozitol-trisz-foszfáton (PIP3) keresztül történik. A PI3K leszabályozása miatt az Akt gátlódik, melynek eredményeképpen csökken az egyébként proapoptotikus Bcl-2-asszociált halál promotor (BAD) fehérje gátló foszforilációja (36).

A HER2 mint onkoprotein

A HER2 túlzott mértékű kifejeződése, „overexpressziója” fontos szerepet játszik több tumor kialakulásban, növekedésében. Aktivációja során proliferatív és antiapoptotikus jeleket közvetít (31,37-39). Az emlőkarcinómák számos típusában a HER2 overexpresszióját figyelték meg, amiért génamplifikáció tehető felelőssé (40). A HER2 az emlőkarcinómák körülbelül 25-30%-ában (41-43), azeken belül invazív duktális emlőtumorsejtek közül az inflammatorikus típus esetén 48%-ban, noninflammatorikus típusban 10%-ban (44), a gyomor karcinómák esetén 17-22%-ban fordul elő (45). Következménye agresszív fenotípusú daganat, rossz prognózissal: a tumorsejtek

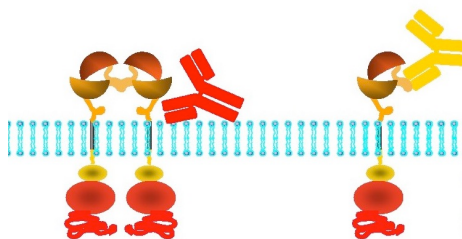
- proliferációs készsége magas (31),
- tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) érzékenysége alacsony (46),

metasztázis képző hajlamuk magas, melynek okaként az adhézis molekulák lecsökkent száma, a megnövekedett sejtmotilitás és aggregációkészség, valamint a fokozott VEGF szekréció jelölhető meg (47). Így ezekben az esetekben rapid klinikai lefolyásra és a kemo- és radioterápiával szembeni rezisztenciára lehet számítani (48).

A HER2 daganatnövekedést fenntartó szerepe magas- és alacsonyszintű expresszió esetén is fontos lehet (49).

HER2 mint terápiás célpont

Annak a felismerése, hogy egyes HER2 ellenes antitestek gátolni tudják a HER2 overexpresszáló sejtek növekedését áttörő hatásúnak bizonyult, és számos, a HER2 és az EGFR extracelluláris része elleni antitest kifejlesztéséhez vezetett (50). Ezek közül a klinikai használatra engedélyezett antitestek az EGFR ellenes cetuximab (Erbix[®], 2004), és a HER2 ellenes trastuzumab (Herceptin[®], 1998) és pertuzumab (Perjeta[®], 2013).



6. ábra. A trastuzumab (piros) és pertuzumab (sárga) kötődése a HER2 molekulához

Trastuzumab (Herceptin[®])

A trastuzumab a szolid tumorok terápiájára legelsőként (1998) engedélyezett (51), HER2-ellenes humanizált monoklonális antitest (6. ábra). Klinikai sikerei miatt ma elsővonalbeli terápiaként szolgál HER2-pozitív metasztatikus emlőkarcinómás betegek számára. A trastuzumabnak *in vitro* antiproliferatív hatása van a HER2-t overexpresszáló tumorsejtekre és hatékony terápiaként szolgál humán emlőtumorok esetére: mind a korai (52), mind a metasztatikus (53) HER2-pozitív emlőrákos betegek prognózisa jelentősen javult.

Lévén az egyik legelső, klinikailag bizonyítottan hatékony antitest, a trastuzumab molekuláris és sejtszintű hatásmechanizmusának feltérképezése számos kutatás tárgyát képezte, mind az antitestre specifikus, mind pedig általánosságban az antitest terápiákra érvényes lehetséges hatásmechanizmusok felderítése céljából.

A trastuzumab a receptor juxtamembrán IV-es extracelluláris domén C-terminális részéhez kötődik (3. ábra) (28). A sejtmembránhoz közeli kötődés hatékony keresztkötést hozhat létre,

ami facilitálja az endocitotikus mechanizmust (54). A trastuzumab kötődése megszakíthatja az interakciókat a HER2 és más fehérjék között is, és sztérikusan blokkolja az indukált proteolitikus hasítás általi HER2 aktivitás-fokozódást (28), amit egyébként a HER2 más epitópjaihoz kötődő antitestek (pl. pertuzumab) nem gátolnak. A HER2 sejtfelszínről endocitózissal való eltávolításának kezdetétől fontos szerepet tulajdonítanak (54). Monovalens trastuzumab Fab fragmentumok nem bírnak a teljes antitesttel hasonló antiproliferatív hatással, ami azt sugallja, hogy a HER2 keresztkötése fontos része a trastuzumab aktivitásnak, vagy az affinitás növeléséhez az antitest bivalenciája szükséges. Bár a trastuzumab mindezen jelátviteli hatásai *in vitro* igen jelentősek, az utóbbi időben egyre több jel mutat arra, hogy *in vivo* az antitest függő sejtes citotoxicitásnak talán még az *in vitro* hatásoknál is fontosabb szerepe lehet (55,56).

A trastuzumab antitest hatékonysága mellett viszont sajnos a daganatok körülbelül felében jellemző az eredendőleg meglévő vagy a kezelés során kialakult rezisztencia (53,57), mely az antitest terápiás kutatásokban központi helyet foglal el (58). A rezisztencia mechanizmusok között leírták az antitest sztérikus gátlását az extracelluláris mátrix fehérjéi által (59), az inzulinszerű növekedési faktor receptor-I fokozott jelátvitelét (60), a PI3K/Akt útvonal aktiválódását (61) és az ADCC mechanizmus károsodását (17,62).

Pertuzumab (Perjeta®)

A pertuzumab (Perjeta®) szintén humanizált monoklonális antitest, amely a HER2 dimerizációs karjához kötődik, távol a trastuzumab kötőhelyétől (6. ábra) (63). Sokkal hatékonyabban bontja meg a ligand-mediált HER3-HER2 komplexképződést, mint a trastuzumab, és mind alacsony, mind magas HER2 expressziójú sejtvonalaknál hatékony lehet. Ennek ellenére az első klinikai kipróbálások, melyekben még Omnitarg néven szerepelt, kudarcba fulladtak (64).

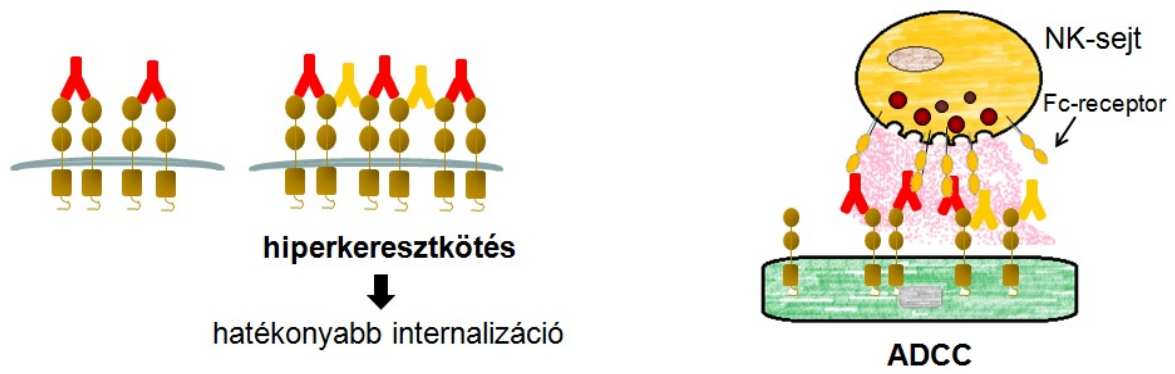
Antitestek alkalmazása kombinációban

Mivel a trastuzumab és a pertuzumab két eltérő epitópot ismer fel a HER2-n, lehetőség van a két antitest egyidejű alkalmazására és célfehérjéhez való kötődésére, s így a tumor terápia alapelvei közé tartozó kombinációs kezelés lehetősége ezen antitestek esetén is felmerült. Állatkísérletek eredményei felvetették a lehetőségét, hogy HER2 ellenes monoklonális antitestek kombinációja növelheti a terápia hatékonyságát, de a mechanizmus ismeretlen maradt (65,66). *In vivo* nude egerekben a trastuzumab és a szintén HER2-ellenes L26 antitest

együttes alkalmazása az *in vitro* trastuzumab-szenzitív N87 jelű gyomor karcinóma sejtek növekedését szinergista módon csökkentette az egyedi kezelésekhez képest (67).

Friedman és munkatársai az *in vitro* kísérletek eredményeiből extrapolálva *in vivo* is az antitest-mediálta internalizáció szerepét hangsúlyozták a kombinációs hatás valószínű mechanizmusaként (67), mivel ez a folyamat hatékonyabbá válik, ha az eltérő epitópot felismerő antitestek kombinációjakor hiperkeresztkötés, és következményesen nagy sejtfelszíni aggregátumok jönnek létre, melyek gyors és hatékony internalizációja gyors HER2 leszabályozást eredményez (7.a, ábra).

A III. fázisú CLEOPATRA (CLinical Evaluation Of Pertuzumab And TRAstuzumab) nemzetközi tanulmány vizsgálta a pertuzumab hatékonyságát a trastuzumab+docetaxel terápiával kombinációban (82). A tanulmány végső eredménye alapján a pertuzumabot tartalmazó rezsim szignifikánsan növelte az előzőleg nem kezelt, HER2-pozitív metasztatikus emlőrákos betegek teljes túlélését a pertuzumabot placeboval helyettesítő protokollal szemben (12,4 hónapról 18,5 hónapra). A CLEOPATRA eredményeinek is köszönhetően a pertuzumabot az Egyesült Államokban 2013-ban engedélyezték lokálisan előrehaladott, inflammatorikus, vagy korai stádiumú HER2-pozitív emlődaganatok neoadjuváns terápiájaként a trastuzumabbal és docetaxellel kombinációban, Európában pedig a metasztatikus vagy lokálisan kiújuló, sebészi eltávolításra nem alkalmas emlőrákban szenvedő betegek számára, akik korábban nem részesültek célzott HER2-ellenes terápiában vagy kemoterápiában a betegségük kezeléseként (68,69). A jelenleg is folyamatban lévő APHINITY (ClinicalTrials.gov azonosítószám: NCT01358877) III. fázisú klinikai tanulmányban pedig tovább vizsgálják a pertuzumab + trastuzumab kombinációs terápia előnyét a trastuzumab monoterápiával szemben sebészi kezelésen átesett HER2-pozitív emlőrákos betegeken. Mivel a HER2-t overexpresszáló emlődaganatok trastuzumab rezisztenciája továbbra is központi probléma (69), a kombinált kezelések hatásmechanizmusainak *in vitro* vizsgálata kulcsfontosságú lehet.



a, b,
7. ábra. A kombinációs kezelések lehetséges hatásmechanizmusai

- a,* Monoterápia során az antitestek hatására internalizálódó HER2 molekulák csak kis csoportokat alkotnak, míg a kombinációs kezelések hiperkeresztkötései nagyobb klasztereket képesek kialakítani, ezáltal az internalizáció hatékonyságát fokozzák.
- b,* Az antitestek Fc részén keresztül az NK sejtek aktivációja a tumorsejtek ölését váltja ki, mely sztérikusan komplementer antitestek esetén hatékonyabb lehet.

Célkitűzések

Irodalmi adatok azt mutatták, hogy egyazon target ellen eltérő epitópokat felismerő antitestek kombinált alkalmazása előnyös lehet mind *in vitro* (67), mind *in vivo* (CLEOPATRA tanulmány). Ezek alapján felmerül a HER2-t eltérő epitópon kötő trastuzumab és pertuzumab antitestek kombinációs alkalmazásának lehetősége.

Mindazonáltal a kombinációs hatás molekuláris és sejtszintű mechanizmusa nem tisztázott. Bár a kombinációs hatást Friedman és mtsai. a hiperkeresztükötés általi hatékonyabb internalizáció miatti HER2 leszabályozásnak tulajdonították, figyelemmel az antitestfüggő sejtes citotoxicitás vélhetően központi *in vivo* szerepére az is elképzelhető, miszerint a kombinációban alkalmazott antitestek sztérikusan komplementer kötőhelyekként szolgálnak a természetes ölüsejtek számára (7.b, ábra).

Ezek alapján az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki:

1. Hatékony, standardizált, radioaktivitástól mentes, kitapadó célsejtekre optimalizált, *in vitro* ADCC vizsgálati módszer kiválasztása.
2. A trastuzumab és pertuzumab kombinált kezelések hatásmechanizmusának *in vitro* és *in vivo* vizsgálata
3. A kombinációs kezelések klinikai relevanciájának feltárása

Anyagok és módszerek

A külön nem jelölt vegyszerek a Sigma Aldrich Kft. (Budapest, HU) termékei. Amennyiben másképp nincs jelölve, az anyagok tárolása 4 °C-on történt.

Általános törzsoldatok és anyagok

1. FCS (Lifetech Hungary, Bp., HU) (fetal calf serum = főtális borjú szérum), -20 °C-on tárolva.
2. DMEM tápoldat: (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich Kft, Bp., HU), 4,5 g/l glükóz, 3,7 g/l NaHCO₃ tartalommal, pH 7,35).
3. RPMI-1640 tápoldat (Roswell Park Memorial Institute) (Lifetech Hungary).
4. JIMT-1 tápoldat: Ham's F-12 (N6760) és DMEM 1:1 arányú keveréke.
5. NK tápoldat: α -MEM (M0644) 10% FCS és 10% ló szérummal kiegészítve (Hyclone SH 30070), glutaminnal, nem-esszenciális aminosavakkal és Na-piruváttal kiegészítve (S8636).
6. TE-oldat: EDTA (etiléndiamin-N,N,N',N'-tetraacetát) 1 mM-os oldata PBS-ben, 0,05% (w/v) tripszinnel (Lifetech), -20 °C-on tárolva.
7. HEPES puffer: 20 mM HEPES (Sigma, N-2-hidroxietyl piperazin-N'-2-etánszulfonsav); pH 7,2; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1,5 mM MgSO₄; 5 mM Na-piruvát desztillált vízben oldva.
8. 1x PBS: 10x PBS-ből (100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 140 mM NaCl) hígítva.
9. 1% BSA-PBS: 0,1 tömeg% bovine (marha) szérum albumin 1x PBS-ben oldva, frissen készítve. BSA por alakban.
10. 1% BSA-DMEM: 1 tömeg% bovine (marha) szérum albumin 10% FCS-t tartalmazó DMEM tápoldatban feloldva, frissen készítve.
11. FA: Formaldehid (Formaldehid Solutio, MOLAR Chemicals Kft., forg.: Hungaropharma Gyógyszerkereskedelmi Zrt.) 35%-os törzsoldata szobahőmérsékleten tárolva.
12. IL-2: Proleukin 18x10⁶ NE, Novartis.
13. Trastuzumab: Herceptin® 150 mg por oldat infúzióhoz való koncentrátum, (Roche Magyarország Kft, Bp., HU).
14. Trastuzumab F(ab')₂: a teljes antitestből pepszines emésztéssel készített.
15. Pertuzumab: 175 mg/7ml i.v. infúzió koncentrátum, Roche.

16. Pertuzumab F(ab')₂: a teljes antitestből pepszines emésztéssel készített.
17. 76.5 antitest: HER2 ellenes antitest, HER2-76.5 hibridóma (Y. Yarden ajándéka, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) által termelt felülúszóból izolálva protein G oszlopon.
18. Cetuximab: Erbitux® 5 mg/ml oldatos infúzió (Merck Kft., Bp., HU).
19. EZ4U (BI-5000, MBL, Biomedica Hungária Kft, Bp.) oldat MTT alapú kolorimetriás teszthez.
20. TritonX-100: 10x törzsoldat, Thermo Fisher Scientific.

Immunfluoreszcenciás jelöléshez

21. A555-76.5 Fab: Alexa Fluor 555 festékekkel konjugált 76.5 jelű HER2 ellenes antitest Fab fragmentuma, > 1 mg/ml koncentrációban, 0,02% NaN₃-dal tartósítva.
22. A546-528: Alexa Fluor 546 festékekkel konjugált 528 jelű HER2 elleni monoklonális antitest, > 1mg/ml koncentrációban, 0,02% NaN₃-dal tartósítva.
23. A647-trastuzumab: Alexa Fluor 647 festékekkel konjugált trastuzumab monoklonális antitest, > 1 mg/ml koncentrációban, 0,02% NaN₃-dal tartósítva.
24. A488-GAMIG: Alexa Fluor 488 konjugált egér ellenes kecske antitest (goat anti-mouse IgG).
25. A488-anti-humán (H+L): Alexa Fluor 488 festékekkel konjugált, humán IgG nehéz és könnyű lánc elleni poliklonális antitest.
26. A657-anti-CD16: Alexa Fluor 647 festékekkel konjugált CD16 ellenes antitest, 3G8 klón, BD Pharmingen.
27. A647-CD45: Alexa Fluor 647 festékekkel konjugált anti-CD45 antitest (CD45.1 klón)
28. A647-76.5: Alexa Fluor 647 festékekkel (Life Technologies, Grand Island, NY) konjugált 76.5 jelű HER2 elleni monoklonális antitest, > 1mg/ml koncentrációban, 0,02% NaN₃-dal tartósítva.
29. A488-76.5: Alexa Fluor 488 festékekkel konjugált 76.5 jelű HER2 elleni monoklonális antitest, > 1 mg/ml koncentrációban, 0,02% NaN₃-dal tartósítva.
30. Anti-humán Fc: humán IgG Fc fragmentum elleni poliklonális kecske antitest (Thermo Fisher Scientific)
31. DAPI: (4',6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid) 1 µg/ml törzsoldata metanolban.
32. Mowiol 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals), 10 w/v%, 0,1 M Tris-HCl-ben, pH 8,5, 25 w/v% glicerinnel

SDS gél elektroforézis

33. Lízis puffer: 40 mM TRIS (pH 7,5), 50 mM NaCl, 20% glicerol, 2 mM EGTA, 1 mM Na-ortovanadát (Na_3VO_4) (foszfatáz inhibitor), 20 mM NaF, proteáz inhibitor koktél, használat előtt + 1 mM PMSF (ser-proteáz inhibitor).
34. Mintapuffer (5 v/v% 2-merkaptotanol, 10mM Tris-HCl, 4% w/v SDS, 10% v/v glycerol, 0,02% v/v brómfenolkék (Reanal), desztillált vízben oldva, pH 6,8), frissen készítve.
35. PBST (0,1% Tween-20 PBS-ben, pH 7,4).
36. Coomassie BB: (Coomassie Brilliant Blue): Coomassie blue R250 (2,5 g), 144 g metanol, 454 ml desztillált víz.
37. Antitestek oldata: antitest (általában 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációban), PBST-ben, 1% normál kecske szérumban (ha a POD- α -mouse kecskében termeltetett, ha nyúlban, akkor normál nyúl szérumban), 1% tejpor.
38. Mosóoldat a blotmembránhoz: 50% metanol, 7% ecetsav desztillált vízben.
39. 10x elektroforézis (ELFO) puffer: 30g TRIS (0,248 M), 144g glicerin, 100ml SDS (10%) 1000 ml térfogatban, pH 8,3; futtatáshoz 10x hígítva desztillált vízben.
40. PVDF-Immobilon P membrán (Millipore Kft., Budapest).
41. Blokkoló oldat: zsírmentes tejpor (SC Biotechnology, CA) 5%-os oldata PBS-ben.
42. Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder (Biocenter, Szeged): fehérje mólsúly standard, -20 °C-on tárolva.

F(ab')₂ preparálás

43. Acetát puffer: 20 mM Na-acetát, pH 4,7.
44. Na-foszfát (50 mM): 0,05 M NaH_2PO_4 desztillált vízben, pH 7,0
45. Amikon Ultra filter, Millipore, UFC 801096.
46. SDS-PAGE 8%-os gél: (5,7 ml desztillált víz, 1,6 ml ProSieve 50 gél oldat, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 ml 10% APS (ammónium-perszulfát), 4 μl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin).
47. TRIS-HCl (2 M): 242g TRIS bázis 1 liter desztillált vízben, pH 8,2
48. Fehérjefestő oldat a blotmembránhoz: 0,1% Amido-black (Reanal), 45% methanol, 10% ecetsav, desztillált vízben.
49. Sephacryl S-300: allil dextrán és N,N'-metilénbiszakrilamid, 20%-os etanollal tartósítva, GE Health Care Life Sciences.

50. Superdex™ 200: keresztkötött agaróz és dextrán mátrix, 20%-os etanollal tartósítva, 4 °C-on tárolva, GE Health Care Life Sciences
51. Pepszin-agaróz: immobilizált pepszin, 5mL 6% keresztkötött agaróz gyöngyben, Thermo Fisher Scientific, pH 4,5.

***In vitro* ADCC kísérletek**

52. Na-heparin: Heparinbene Na 25 000 I.E. injekció, Ratiopharm.
53. Histopaque®-1077: 1,077 g/ml sűrűségű szeparáló oldat.
54. FDA: fluoreszcein-diacetát, 1 mg/ml törzsoldat.
55. CFDA, SE: CFSE kevert izomer, 10 mM törzsoldat DMSO-ban, Thermo Fisher Scientific, -20 °C-on tárolva
56. PI: propidium jodid, 1 mg/ml törzsoldat készítve propidium jodid porból desztillált vízben.
57. PanToxiLux kit: fluoreszcens citotoxicitás vizsgálatához; OncoImmunin, Inc (Gaithersburg, MD, USA).
58. NFL1: sejtmag jelölő fluoreszcens festék, OncoImmunin, Inc (Gaithersburg, MD, USA).
59. TFL4: célsejtet megjelölő intracelluláris fluoreszcens festék, PanToxiLux “kit” része, OncoImmunin, Inc (Gaithersburg, MD, USA).

***In vivo* xenograft kísérletek**

60. SCID egerek: SCID (C.B-17/Icr-Prkdc^{scid} / IcrIcoCrl, Fox-Chase); Charles River Laboratories
61. Matrigel: Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) egér sarcoma sejtek által termelt gelatinosus fehérje keverék, -70 °C-on tárolva, BD Biosciences, 356237
62. HANKs A puffer: 2 M NaCl, 1 M Na₂SO₄, 1 M KCl, 1 M NaH₂PO₄, MgCl₂, 1 M CaCl₂, 1 M glükóz, 1 M HEPES desztillált vízben oldva, pH 7,4.
63. Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific

Sejtenyésztő kamrák

64. 8W10E plate: 8-lyukú, mikroelektrodákat tartalmazó plate ECIS Z0 sejtanalizátorhoz, Applied Biosciences
65. Poly-L-Lysine bevonatú 2x9 lyukú kamra, Ibidi

Sejtvonalak és tenyésztésük

Kísérleteinkhez célsejt (target) sejtvonalként HER2-t nagymértékben kifejező (overexpresszáló), kitapadva növe építeliális morfológiájú sejteket használtunk. A célsejtként használt, emlőtumorból származó sejtvonalak valamennyien nagy számban fejezik ki az EGFR és HER2 receptorokat.

ADCC vizsgálatához élő sejtvonalként frissen szeparált perifériás mononukleáris sejteket illetve immortalizált NK sejtvonalat használtunk.

Minden sejtvonalat rutinszerűen ellenőriztünk mikoplazma fertőzésre.

Az **SKBR-3** (forrás: American Type Culture Collection) duktális emlőkarcinómából tenyésztett kultúra, a sejtfelületen sejtenként 180.000 EGFR-t és 800.000 HER2-t expresszál. Az irodalomban széles körben használt és az egyik legjobban jellemzett HER2 pozitív emlőtumor vonal. Trastuzumabra *in vitro* érzékeny, SCID egérben nem növeszthető.

A **BT-474** (forrás: American Type Culture Collection) jelű sejtvonal szintén invazív duktális emlőkarcinómából tenyésztett kultúra. Sejtfelületén sejtenként körülbelül 60.000 EGFR és 1,2 millió HER2 található. Trastuzumabra *in vitro* mérsékelten érzékeny. Ösztrogénnel kezelt nőstény SCID egérben növeszthető, de rendkívül lassan nő.

A **JIMT-1** (Jorma Isola szívességéből) klinikailag rezisztens humán emlőkarcinóma pleurális effúzió metasztatizációjából előállított sejtvonal (Cancer Biology, University of Tampere, Finnország) (70). Amplifikálódott HER-2 génnel sejtenként 160.000 EGFR és 600.000 HER2 molekulát expresszál. Trastuzumabra *in vitro* rezisztens, SCID egérben növeszthető, ott frissen inokulálva kezdetben ADCC miatt trastuzumabra érzékeny (56).

A sejteket a számukra előírt tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó, párasított légtérű termosztátban, 37 °C-on tenyésztettük. SKBR-3 esetén DMEM tápoldatot 10% FCS-sel, BT-474 esetén RPMI tápoldatot + 10% FCS-sel kiegészítve használtunk, JIMT-1 sejtek számára 20%-os FCS-sel kiegészített JIMT-1 médiumot használtunk, 300 U/L inzulin jelenlétében. A passzálás körülbelül háromnaponta konfluens sejtkultúránál történt. A tenyészetet konfluensnek tekintettük, ha a sejtek legalább 5-15-sejtes csoportokban érintkeztek egymással, a BT-474 esetében nagyobb sejtcsoportok alakultak ki. A JIMT-1 sejtek jellemzően lassabban növekvő sejtek. A passzáláskor a sejteken lévő médium eltávolítása után a sejtek felválasztása a tenyésztőedényről 0,05% tripszint és 1 mM EDTA-t tartalmazó standard tripszin-EDTA pufferrel történt. 3 perc után az oldat hatását 10% FCS tartalmú

tenyésztőoldattal állítottuk le. A médiumban pipettával szuszpendáltuk fel a sejteket. A sejteket 2-3-szoros hígításban új sejttenyésztő edényben helyeztük vissza az inkubátorba.

A **CD16.176V.NK-92** (továbbiakban röviden: NK-92 vagy NK-sejt) NK-sejtes fenotípusú non-Hodgkin lymphomás betegből izolált és immortalizált (humán) sejtvonal, nagy affinitású (176V) FcγRIIIA (CD16) receptorral stabilan transzfektálva (forrás: Dr. Kerry S. Campbell, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA) (71,72). A sejtvonal egyik variánsa a nagy affinitású CD16 receptorral együtt eGFP-t ko-expresszál. A transzfektált sejtvonalak mellett a módosítatlan NK-92 immortalizált anya-sejtvonal is rendelkezésünkre állt. A sejteket speciális NK médiumban növesztettük, 100 IU/ml IL-2 mellett. Az immortalizált NK-92 sejtvonalat a perifériás mononukleáris sejtekkel szemben azért részesítettük előnyben, mert általuk könnyebben biztosítható volt a kísérletekben az NK-sejtek azonos hatékonysága. A nagy affinitású receptorral transzfektált variáns pedig az akár normálisan kismértékű hatást felerősítve lehetővé teszi annak detektálhatóságát és könnyebb kiértékelését.

Áramlási citometriás vizsgálatok

A sejtek felvétele a médium leszívása után standard tripszin-EDTA-val történt, az oldat hatását a sejttípusnak megfelelő, FCS tartalmú médiummal állítottuk le. A sejteket sorter csövekbe gyűjtve mostuk hideg (4 °C-os) HEPES-sel. Amennyiben máshogy nincs jelezve, a jelölés jégen, sötétben történt. A sejteket 50 µl HEPES-ben, 10 µg/ml antitest végkoncentrációban jelöltük 10 percig, majd mosás után szükség szerint másodlagos antitesttel jelöltünk, szintén 10 µg/ml-es végkoncentrációban, további 10 percig. A jelölés után kétszer mostuk HEPES-sel, majd 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk a sejteket.

A méréseket BD FACScan, BD FACSCalibur vagy BD FACSAria III áramlási citométeren végeztük, mintánként 10 vagy 20 ezer eseményt regisztrálva. A gerjesztést és az emisszió detektálását az adott fluoreszcens jelölésnek megfelelő beállításokkal végeztük (2. táblázat).

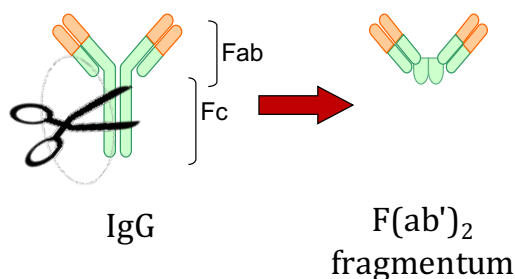
A mérések kiértékelését az FCS Express (De Novo Software, Glendale, CA, USA) programmal (v3, v4 és v6 verziószám, Research Use Only) végeztük.

Kísérlet	Fluoreszcens anyag	Gerjesztési hullámhossz (nm)	Detektálás hullámhossz tartomány (nm)	Eszköz
Fluoreszcens jelölés	FITC	488	530/30 (FL1)	FACScan, FACSCalibur
	Alexa Fluor 488	488	530/30 (FL1)	FACScan, FACSCalibur
	Alexa Fluor 647	633	661/16 (FL4)	FACSCalibur
Citometriás ADCC	CFSE	488	530/30 (FL1)	FACSCalibur
	PI	488	670LP (FL3)	FACSCalibur
	AlignFlow	csak FSC-SSC	FSC (488/10) SSC (488/10)	FACSCalibur
PanToxiLux	NFL1	405	450/20	FACSAria
	TFL4	633	660/20	FACSAria
	szubsztrát	488	530/30	FACSAria

2. táblázat. Fluoreszcens jelölőanyagok gerjesztéséhez és detektálásához használt beállítások

Antitest F(ab')₂ fragmentumok készítése

A teljes antitestekből állítottuk elő azok F(ab')₂ fragmentumát, leválasztva az Fc részt, mely során az antitest két „ab” része diszulfid hidakkal még összekapcsolódva marad (8. ábra).



8. ábra. A teljes antitestből az Fc rész megfelelő eltávolítása után F(ab')₂ fragmentum keletkezik

20 mg IgG antitestet (trastuzumabot, ill. pertuzumabot) 20 mM-os acetát pufferben (pH 4,5) feloldottunk, háromszor dializáltuk ugyanezen pufferbe Centricon-10-es csöveket használva, majd Amicon Ultra filteren keresztül koncentráltuk. Az antitest Fc részének emésztését 0,5 ml immobilizált pepszinnel végeztük 37 °C-on, állandó kevergetés mellett. A reakciót 10 ml 2 M Tris-sósavval állítottuk le (pH 8,2). Az agaróz gyöngyökhöz kötött immobilizált pepszint 5 perces centrifugálással (300 x g) távolítottuk el, az emésztett mintákat Amicon Ultra szűrővel

töményítettük. Az $F(ab')_2$ fragmentumokat az emésztetlen antitesttől méretkizárásos kromatográfiával választottuk el. A trastuzumab esetén Sephacryl S-300 gyantával töltött 10×800 mm-es oszlopot, a pertuzumab esetén Superdex 200 gyantával töltött oszlopot használtunk. Az oszlopot 50 mmol/l koncentrációjú Na-foszfáttal (pH 7,0) mosva 0,5 ml-nyi frakciókat gyűjtöttünk. A frakciók abszorbanciáját NanoDrop ND 1000-rel (Thermo Scientific) mértük. A frakciókból vett mintákat nem-redukáló SDS-PAGE-sel teszteltük. A megfelelő frakciókat összeöntöttük és Centricon-50-es csövekkel töményítettük, 0,11 μ l-es szűrővel sterilre szűrtük és -20°C -on tároltuk. A HER2-kötés affinitását és az ADCC-mediálás hiányát ellenőriztük.

Antitestek konjugálása fluoreszcens festékekkel

A direkt immunfluoreszcenciás jelölésekhez a trastuzumab és pertuzumab egész antitestek és $F(ab')_2$ fragmentumaik fluoreszcens festékekkel közvetlenül jelölt változataira volt szükség. Ehhez Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 647 monofunkcionális aminreaktív festékekkel konjugáltuk a gyári teljes antitesteket és az azokból általunk előállított $F(ab')_2$ fragmentumokat, a festék gyártói protokollja szerint.

HER2-kötés affinitás vizsgálata

$F(ab')_2$ fragmentumok HER2 affinitását a kiindulási teljes antitestekével hasonlítottuk össze. SKBR-3 sejtek HER2 molekuláinak direkt immunfluoreszcenciás jelölését végeztük.

A sejtek felvétele a médium leszívása után standard tripszin-EDTA-val történt, az oldat hatását 10% FCS tartalmú DMEM-mel állítottuk le. A sejteket sorter csövekbe gyűjtve mostuk hideg (4°C -os) HEPES-sel. A sejtfelszíni immunfluoreszcenciás jelölést jégén, sötétben végeztük.

A sejteket először az Alexa Fluor 488 konjugált trastuzumab $F(ab')_2$ vagy szintén Alexa Fluor 488 konjugált pertuzumab $F(ab')_2$ antitesttel jelöltük tízszeres feleslegben (600 mM végkoncentráció), 50 μ l-ben, 10 percig. Ezután a teljes antitestet adtuk a szuszpenzióhoz telítő koncentrációban (60 mM) 10 percig.

A jelölést elvégeztük fordított sorrendben is, a teljes IgG antitesttel 10-szeres telítő koncentrációjú jelölés után az $F(ab')_2$ párját telítő koncentrációban adva. Mindegyik jelölő antitesttel kontroll egyedüli jelölést is végeztünk 10-szeres telítő koncentrációban (600 nM), 10 percig. A sejteket 1%-os PFA-ban fixáltuk és áramlási citométeren mértük.

Fc fragmentum hiányának vizsgálata indirekt jelöléssel

A jelölést szintén szuszpenzióban lévő SKBR-3 sejten végeztünk. A sejtek felvétele az affinitás vizsgálatban leírtaknak megfelelően történt, a jelölést trastuzumab és pertuzumab antitestre is hasonlóan elvégeztük.

Az SKBR-3 sejteket IgG vagy F(ab')₂ antitesttel jelöltük 10 µg/ml végkoncentrációban 10 percig szobahőmérsékleten, majd HEPES-sel mostuk. A másodlagos jelölőoldat az Fc-fragmentumot felismerő, Alexa Fluor 488 konjugált monoklonális anti-humán Fc antitestet vagy könnyű és nehézláncot is felismerő poliklonális Alexa Fluor 488 konjugált anti-humán (H+L) antitestet tartalmazott 10 µg/ml végkoncentrációban. A másodlagos jelölés 10 percig tartott, majd HEPES mosás után a sejteket 1%-os PFA-ban fixáltuk és áramlási citométeren mértük.

***In vitro* sejtproliferáció vizsgálata**

A sejtproliferáció *in vitro* vizsgálatát MTT alapú kolorimetriás módszerrel, EZ4U „kit” felhasználásával végeztük.

Az módszer alapja, hogy az élő, metabolikusan aktív sejtek a sárga tetrazólium MTT-t (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólium bromid) lila színű formazanná alakítják, azaz a szubsztrát és a keletkezett termék fényabszorpciós tulajdonságai eltérőek. Ezt a redukciós folyamatot a mitokondriális enzimek végzik.

A sejteket 96-lyukú tenyésztőedényben, 3 napig inkubáltuk az antitestek vagy F(ab')₂ fragmentumaik jelenlétében. A tetrazólium sóval történt 2-4 órás inkubáció után a metabolikus termék abszorpcióját Synergy HT Multi-Detection microplate Reader-rel (Bio-Tek) mértük. A 488 nm-es abszorpciót gyártói előirat szerint korrigáltuk a 620 nm-en mért (háttér) abszorpcióval.

Mivel a mitokondrium a sejthalál után pár perccel inaktiválódik, a teszt populáció szinten alkalmas az élő sejtek összes mitokondriális aktivitásának a megbecslésére, amely azonos állapotú sejtek esetén várhatóan arányos a sejtszámmal. Az abszorpciós értékek relatív arányai az egyes kísérletekben összevethetők.

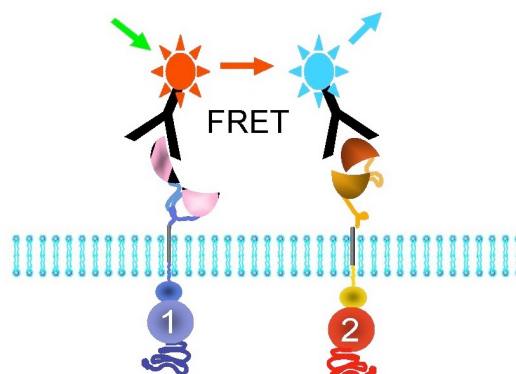
A 96-lyukú plate-ben 1.000-től 32.000-ig növekvő számban elhelyezett sejtpopulációk alapján sejtszám - abszorpciós kalibrációs görbét készítettünk.

A proliferációs kísérleteket minden alkalommal legkevesebb triplikátban vagy annak többszörösében végeztük, és legalább háromszor ismételtük. A sejt nélküli lyukak korrigált abszorpciójának átlagát háttérként minden sejtes lyuk értékből levontuk. Az azonos kezelési csoportba tartozó minták abszorpciós értékeit átlagoltuk, majd a kezelések átlagait a

kezeletlen minták abszorpciós értékének az átlagára normáltuk. A független kísérletekből nyert valamennyi ilyen értékből számítottunk átlagot és szórást (SD).

Förster (fluoreszcencia) Rezonancia Energia Transzfer (FRET)

Az EGFR-HER2 asszociáció vizsgálatához mikroszkópos akceptor fotoelhalványításos Förster (fluoreszcencia) rezonancia energiatranszfer (FRET) módszert alkalmaztunk (73). Az EGFR-hez kötött antitesten lévő donor fluorofort a HER2-höz kötött antitest akceptor fluoroforja fizikai közelség esetén részlegesen kioltja (9. ábra). A FRET létrejöttéhez szükséges, hogy a két festékmolekula olyan közel legyen



9. ábra. A Förster rezonancia energia transzfer

egymáshoz, ami alapján elmondhatjuk, a két jelölt receptor molekuláris kapcsolatban van egymással, a dimerképződés létrejött. Az akceptor fotoelhalványításos módszer során az akceptor fluorofort fotoelhalványítással kiégetjük, meggátolva ezáltal a donor molekula kioltását, így a donor fluoreszcenciája megnő. A növekedés mértékéből energiatranszfer térkép számítható.

Az EGFR direkt jelölésére A546-528 antitestet, a HER2 jelölésére A647-trastuzumabot használtunk. A FRET mérések során először képet vettünk fel az A546 – A647 festékpárokról, majd az A647 festéket maximális lézer intenzitás mellett kiégettük, ezután az első felvétellel azonos műszerbeállítással ismételt képet vettünk fel mindkét csatornában. Az A546 fluoreszcencia-intenzitás növekedéséből pixelenként FRET hatásfokot számoltunk az AccPbFRET programmal (74) az $E = 1 - I_0^{d+a} / I_0^d$ képlet alapján, ahol „E” az energiatranszfer hatásfoka, „ I_0^{d+a} ” a donorról az akceptor kiégetése előtt, míg „ I_0^d ” az akceptor kiégetése után készült kép intenzitása (73). Az energiatranszfer pixelenkénti hatásfokát több mint öt látómezőből átlagoltuk a háttér feletti HER2 jelet adó pixelekre. A méréseket Zeiss LSM 510 konfokális lézerpásztázó mikroszkópon végeztük.

In vitro ADCC vizsgálati módszerek

FDA és CFSE jelölés

A fluoreszcens festék-felszabadulás méréshez (release assay) a frissen feltripszinezett JIMT-1 sejteket steril PBS-ben vettük fel, 1 millió sejt/ml sűrűségben, 10 µg/ml fluoreszcein diacetát (FDA) vagy karboxifluoreszcein diacetát szikcimidil észter (CFSE) kevert izomerjeiből álló fluoreszcens festéket tartalmazó DMEM médiumban jelöltük 30 percig, 37 °C-on.

Bár a JIMT-1 sejtek tenyésztéséhez JIMT-1 médiumot használtunk, indikátormentes JIMT-1 médium előállítására nem volt lehetőségünk, mert indikátormentes alapanyagok nem elérhetőek kereskedelmi forgalomban. Mivel a fluoreszcens anyagok mennyiségének mérését az indikátor nagymértékben befolyásolná, ezért inkább indikátormentes DMEM-et használtunk. A DMEM összetételét tekintve a JIMT-1-hez leginkább hasonló médium és a JIMT-1 sejtek a kísérlet időtartamán belül jól tolerálták.

A sejteket háromszor mostuk indikátormentes DMEM-ben 37 °C-on, 1, 5 és 10 percig az ADCC fluoreszcens festék-felszabaduláson alapuló vizsgálathoz, illetve 10, 20 és 30 percig a célsejtek áramlási citometriás ADCC kísérletekhez történő jelölésekor.

A spontán felszabadulás időfüggésének vizsgálatához a JIMT-1 sejteket 24-lyukú sejttenyésztő kamrában helyeztük el, 100.000 sejt/lyuk sűrűségben, JIMT-1 médiumban. 24 óra múlva a sejteket kitapadt állapotban 10 µg/ml FDA-t vagy CFSE-t tartalmazó steril PBS-sel jelöltük 30 percig, 37 °C-on. Ezt háromszori mosás (3x1 perc) követte indikátormentes DMEM-mel, 37 °C-on.

FDA és CFSE spontán felszabadulásának vizsgálata

A fluoreszcens festékekkel jelölt JIMT-1 sejtekből a festékek 24-órás spontán felszabadulásának (release) vizsgálatához a jelölt JIMT-1 sejteket 96-lyukú sejttenyésztő kamrába tettük, az eredmények fejezetben jelölt sejtszámoknak megfelelően, 200 µl térfogatú indikátormentes DMEM-ben. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on (ez az idő a letapadásukhoz is elegendő volt), majd a felülúszó óvatos szuszpendálása után 100 µl-nyi mintát egy másik 96-lyukú plate-be pipettáztunk fluoreszcenciás mérés céljából.

A sejtekben visszamaradt festék becsléséhez a sejteken maradt médiumot friss, indikátormentes médiumra cseréltük, és a sejteket lizáltuk Triton X-100 hozzáadásával, 0,1% végkoncentrációban.

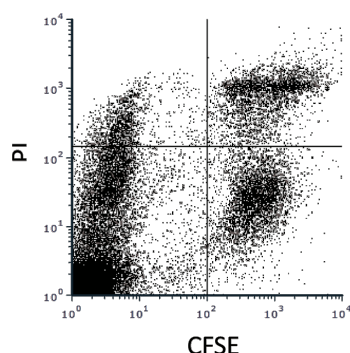
A spontán felszabadulás időfüggésének vizsgálatához a 24-lyukú plate-ben növesztett és kitapadva jelölt JIMT-1 sejtekhez a mosás után 1 ml indikátormentes DMEM-et adtunk.

Adott időpillanatokban 100 µl mintát vettünk minden lyukból a felülúszó óvatos, de alapos szuszpendálása után, és a mintát 96-lyukú plate-be helyeztük későbbi fluoreszcens méréshez. A fluoreszcencia mérését Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader-rel (Bio-Tek) végeztük, alsó optikával, 485/20 gerjesztő és 538/20 emissziós szűrőt alkalmazva, 50-es érzékenységgel. A mért fluoreszcenciát korrigáltuk a kontrollként lemerített indikátormentes DMEM értékének levonásával, valamint az egymást követő időpontokban a mintavételezés miatt csökkenő összterfogatra is.

CFSE- és PI-alapú áramlási citometriás ADCC mérés

A frissen feltripszinezett JIMT-1 sejteket CFSE-vel jelöltük (lásd „FDA és CFSE jelölés”), majd indikátormentes DMEM-ben szuszpendáltuk, és 200 µl térfogatban 100.000 sejtet sorter csövekbe raktunk. A JIMT-1 célsejtekhez 300 µl NK-médium szuszpenzióban 200.000 NK-sejtet adtunk (az aspecifikus aktiváció csökkentése érdekében IL-2 hozzáadása nélkül). A trastuzumabot 10 µg/ml végkoncentrációban adtuk a kezelendő mintákhoz.

A 37 °C-on történő inkubáció alatt a mintákat fénytől védtük. 5 órán keresztül adott időpontokban 100 µl-nyi mintát vettünk mindegyik csőből. A 100 µl-nyi mintához azonnal propidium jodidot adtunk 5 µg/ml végkoncentrációban, és a mintát a PI hozzáadása után 5 perc múlva mértük (10. ábra) BD FACSCalibur áramlási citométeren, 20.000 esemény regisztrálásával. A fluoreszcens festékek gerjesztési és detektálási beállításait a 2. táblázat tartalmazza. A mintákban lévő sejtszámok becsléséhez mintánként egyenlő mennyiségű, (Alexa Fluor 647-tel jelölt) 2,5 µm nagyságú AlignFlow gyöngyöket adtunk a mintákhoz. Az AlignFlow gyöngyök számát méretük alapján az FSC-SSC dotplot-on pontosan meghatározhattuk, a gyöngyök Alexa Fluor 647 jelét nem használtuk fel.



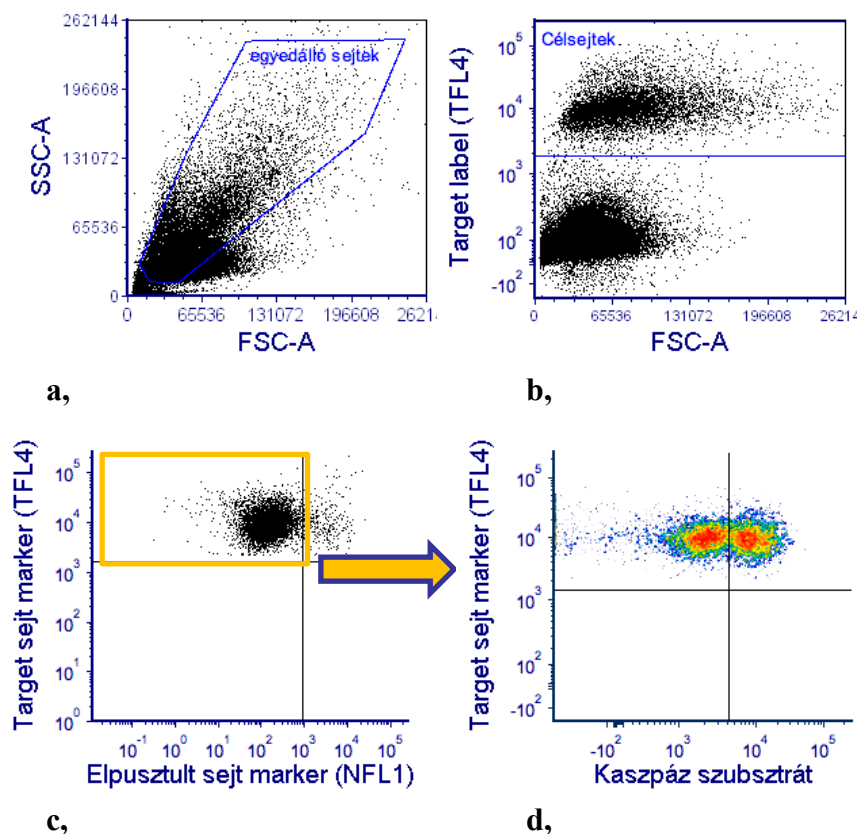
10. ábra. CFSE- és PI-alapú áramlási citometriás ADCC mérés.

A CFSE-vel jelölt célsejtek a jobb kvadránsokban, a CFSE-negatív ölü sejtek és törmelék a bal oldali kvadránsokban vannak. A PI-pozitív célsejtek a jobb felső kvadránsban találhatóak.

PanToxiLux teszt

A PanToxiLux fluoreszcenciás citotoxicitás teszt olyan szubsztrátot tartalmaz, amelyre a sejtmembrán permeábilis, és amelyet az ölü sejtek által elölt célsejtekben aktivált granzim B és kaszpáz 8 proteázok hasítással fluoreszkáló festékké alakítanak. A vizsgálat során a célsejtek és az NK-sejtek elkülönítéséhez a korábbi CFSE-jelölés helyett a „kit” részét képező TFL4 fluoreszcens festékkel jelöltük a célsejteket. A célsejteket először NFL1 és TFL4 intracelluláris festéket tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk, 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd kétszer mostuk, a „kit” felhasználói utasításait követve. Az NFL1 festék a PanToxiLux „kit” mellé kiegészítőként rendelhető, célja a kísérlet megkezdésének pillanatában már elpusztult sejtek megjelölése (ezek sejtmembránján képes áthatolni, de élő sejtekbe nem jut be) annak érdekében, hogy a kiértékelés során ezen sejteket kizárhassuk. A TFL4 megjelöl minden célsejtet, mellyel célunk a célsejtek elkülönítése az élő sejtektől. A célsejtek (100.000/minta) és effektor sejtek (250.000/minta) koinkubációját a „kit” útmutatása alapján végeztük, 50 µl PanToxiLux szubsztráttal, az ADCC-t mediáló antitesteket az eredményeknél jelzett koncentrációkban hozzáadva, 40 percig, 37 °C-on.

A mintákat BD FACSAria III áramlási citométeren mértük, minden mintából 30.000 eseményt regisztrálva. A gerjesztési és emissziós beállításokat a 2. táblázat tartalmazza. Az áramlási citometriás mérés kapuzását a 11. ábra magyarázza.



11. ábra. A PanToxiLux ADCC teszt áramlási citometriás mérése.

- Az FSC-SSC dotploton a célsejtekre figyelve az egyedüli sejtek populációját határozzuk meg.
- A kikapuzott sejtekből a TFL4–FSC-A dotploton kijelöltük a TFL4-pozitív célsejtjeinket.
- A tisztán célsejteket tartalmazó populációból a TFL4-NFL1 dotploton az NFL1-negatív sejtekre szűkítettük a kaput.
- Az NFL1-negatív, TFL4-pozitív sejtek populációjában vizsgáltuk a granzim B és a kaspázok aktivációját, azaz a „halálos csapás”-t kapott sejteket a kaspáz szubsztrát segítségével.

Impedancia alapú sejtanalizátor

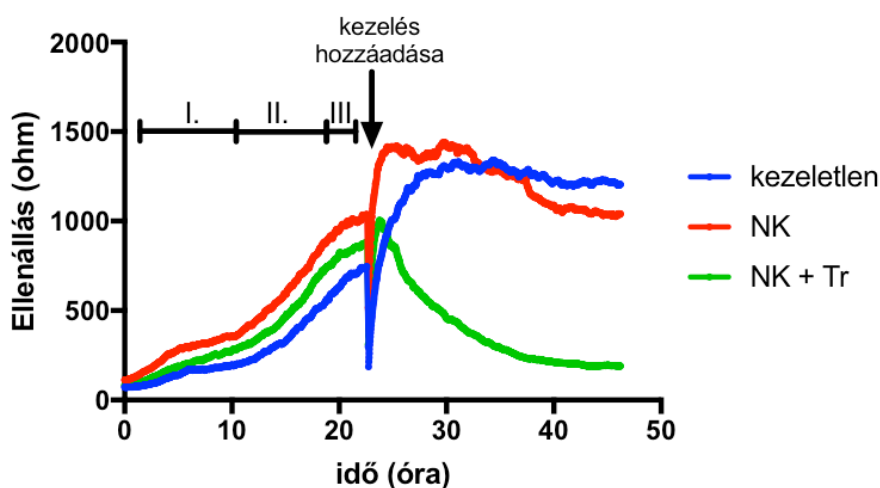
A disszertációban bemutatott kísérleti eredmények az ECIS Z Θ (Applied Bioscience, Troy, NY, USA) impedancia alapú sejtanalizátor rendszer alkalmazásával készültek.

Az előkísérletek alapján az JIMT-1 célsejtek ADCC általi pusztulásának vizsgálatához a 4000 Hz frekvencián mért ohmikus ellenállás volt a legmegfelelőbb, mivel ezen a beállításokon mértük a legnagyobb amplitúdójú változásokat a specifikus hatásokra, miközben a sejtek spontán változásai (pl. sejtmozgások) elhanyagolható mértékben befolyásolták a mérést (12. ábra).

Az *in vitro* ADCC vizsgálatához a mikrotiter lemezekbe kamránként 90.000 JIMT-1 sejtet raktunk. 24 óra inkubációs idő alatt a sejtek letapadnak (I. szakasz) és szétterülnek (II.

szakasz) a kamra lyukainak alján, lefedve a mikroelektródákat; a mért ellenállás eléri a maximális értéket, és azon marad (III. szakasz „plató”) (12. ábra).

A 90.000 JIMT1/lyuk sejtdenzitást előkísérletek során határoztuk meg, hogy a sejtek teljes mértékben befedjék a rendelkezésre álló felületet, és a letapadás és szétterülés után a mért ellenállás elérje a plató szakaszt. További sejtnövekedés a kontakt gátlás miatt nem várható (a JIMT-1 sejtek monolayer módon nőnek), és a teljes lefedettség miatt az ellenállás is eléri maximális lehetséges értékét. Miután a mért ellenállás elérte a plató fázist, a kezelő ágenseket és NK-sejteket a rendszerhez adtuk. A mérést addig végeztük, amíg a mért ellenállás elérte a minimális értéket, és már nem csökkent tovább (24-48 óra).



12. ábra. Az ohmikus ellenállás értékek az idő függvényében impedancia alapú sejtanalizátor készüléken.

A mérés a sejtszuspenzió lyukba helyezése után közvetlenül kezdődött. Az egyes szakaszok történései:

- I. Leülepedés: A sejtek leülepednek és kis felületen letapadnak
- II. Szétterülés: A sejtek szétterülnek és nagy felületen letapadnak
- III. Plató fázis: A letapadt sejtek befedik a rendelkezésre álló felületet (a sejtszám ezt figyelembe véve, ennek érdekében volt meghatározva).

A kezelés hozzáadása után az egyes lyukakban az ellenállás a kezeléstől függően: plató fázisban marad (kezeletlen), enyhén csökkenő tendenciát mutat (NK kezelés), jelentősen csökken (NK + trastuzumab antitest kezelés).

A különböző lyukakban mért mérési adatok egymással való összehasonlíthatósága érdekében a következő korrekciókat és normalizálásokat alkalmaztuk:

1. **Alapellenállásra korrigálás:** minden mért értékből kivontuk a lyukakban letapadó sejtek jelenléte nélkül, de azonos mennyiségű és típusú folyadékkal mért (alap)ellenállást.

2. **Kezelés utáni csúcscellenállásra normalizálás (sejtindex):** Az alapellenállásra korrigált mért értékeket a kezelés hozzáadása utáni mért első csúcs ellenállás értékével osztottuk. A kapott értéket *sejtindex*nek nevezzük.
3. **Csak-NK kezeltre normalizálás (normalizált sejtindex):** Az egyes lyukak sejtindexét a megegyező időpontban csak-NK kezelést kapott lyuk sejtindexével (vagy lyukak sejtindex-átlagával) osztottuk.
4. **Átlagolás:** Az azonos kezelést kapott lyukak normalizált sejtindexét átlagoltuk, és szórást, illetve SEM-et számoltunk.

***In vitro* ADCC immunszinapszis-képződés vizsgálata**

JIMT-1 sejteket Poly-L-Lysine bevonatú 2x9 lyukú mikroszlide-ban 50.000 sejt/cm² sűrűségben helyeztünk el, és növesztettünk 2 napig JIMT-1 médiumban. Ezt követően a sejtekhez trastuzumab és pertuzumab teljes antitesteket vagy F(ab')₂ fragmentumaikat 10 µg/ml végkoncentrációban tartalmazó 20 µl indikátortmentes NK-médiumot adtunk, 37 °C-on 10 percig inkubáltuk, majd 120.000 eGFP-t koexpresszáló NK-92 sejtet adtunk minden lyukhoz 20 µl médiumban, és további 10 percig 37 °C-on koinkubáltuk.

A fluoreszcensen jelölt antitesteket 10 µg/ml végkoncentrációban alkalmaztuk. A CD16 Alexa Fluor 647-tel konjugált anti-CD16 antitesttel (3G8 klón, BD Pharmingen), a HER2-t A555-76.5 Fab antitesttel jelöltük.

Xenograft tumorok in vivo vizsgálata SCID egérben

A kezelések JIMT-1 sejtekből álló xenograft daganatra gyakorolt hatását SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) egerekben vizsgáltuk. Az általunk használt C.B-17/lcr-Prkdc^{scid}/lcrIcoCrl törzs esetén a DNS-függő protein kináz defektusa miatt nem történik meg az antigénfüggetlen limfocita érés során a V(D)J rekombináció. Az ilyen egerek kifejezetten alkalmasak transzplantációs kísérletekre, mert nincs szükség a kísérlet során immunszuppresszióra, az antitest képzés zavara miatt szervezetük immunrendszere nem tud fellépni a testidegen sejtekkel és anyagokkal szemben. Természetes ölüsejtjeik viszont vannak, és ezek antitest felismerése és ölési mechanizmusa megtartott.

A SCID (C.B-17/lcr-Prkdc^{scid} / lcrIcoCrl, Fox-Chase) egereket a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ Kísérleti Állatház (nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015) „MD” területén tenyésztették, a kezeléseket és rendszeres méréseket az SPF minősítésű részlegen végeztük. Csak 100 ng/ml alatti IgG antitest szintű állatokat használtunk. Az állatok terminálása nyaki diszlokációval történt.

A xenograft oltás az egerek 7 hetes korában történt, 100 µl Hanks' A bufferben szuszpendált 5×10^6 JIMT-1 sejt és ezzel megegyező térfogatú Matrigel keverékének szubkután (s.c.) injekciójával. A keveréket és injekciós szereléket az oltásig jégen tartottuk, hogy a Matrigel-t folyékony állapotban tartsuk. Egerenként 2 xenograft oltás történt a 2 hátsó végtagnak megfelelően dorzálisan.

A kezelést a JIMT-1 sejtek s.c. injekciója után azonnal elkezdtük, hetente két alkalommal, a kísérlet befejezéséig vagy az állat terminálásáig. Kezeléseket intraperitoneálisan oltottuk, mindegyik antitest vagy $F(ab')_2$ fragmentum esetén 100 µg dózisban (5 µg/testtömeg gramm) 100 µl térfogatú HEPES pufferben. Ezt azt jelenti, hogy az $F(ab')_2$ -k esetén nagyobb moláris mennyiséget adtunk, amellyel a kisebb méret miatti feltehetően gyorsabb vese clearance-t gondoltuk kompenzálni*. Egy kezelési csoport 6-8 egerből állt (trastuzumab: $n = 8$, trastuzumab $F(ab')_2$: $n = 7$, pertuzumab: $n = 8$, pertuzumab $F(ab')_2$: $n = 7$, trastuzumab+pertuzumab: $n = 8$, trastuzumab $F(ab')_2$ + pertuzumab $F(ab')_2$: $n = 7$, HEPES kontroll: $n = 7$).

A heti kétszeri kezelés során egyúttal a daganat kiterjedését is mértük digitális tolómérővel. A térfogatot a daganat három egymásra merőleges irányban mért kiterjedésének szorzatával becsültük. Amennyiben egy kezelési csoportban az átlagos tumortérfogat elérte az 1200 mm^3 -t, a csoport minden egyedét termináltuk. A kísérletet az oltástól számított 73. napon az utolsó csoport terminálásával zártuk.

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával (# 4/2012/DE MÁB), a szükséges engedélyek birtokában végeztük. Minden állatkísérlet a FELASA útmutatónak és a DIN EN ISO 9001 szabályozásnak megfelelően zajlott.

Tumor xenograft metszetek és immunfluoreszcens jelölésük

Az egerek terminálása után a boncolás során a daganatokat és a belszerveket eltávolítottuk, és azonnal fagyasztottuk. A fagyasztás cryomátrixos ágyban, folyékony nitrogénben (-196°C) hűtött izopentánba mártással történt, mely után a mintákat -72°C -on tároltuk további feldolgozásig.

* Nem ismert pontosan, hogy a $F(ab')_2$ kisebb mérete miatt az egész antitesthez képest mennyivel gyorsabban ürül, így 3:2 molarány csak becslés, melyet a $F(ab')_2$ hatásának korábbi kísérletekből ismert hiánya miatt nem pontosítottunk tovább.

A fagyasztott mintákból 14 µm vastag metszet sorozatokat készítettünk Shandon Cryotome segítségével -24 °C-on, majd a metszeteket levegőn szárítottuk. Fixálószer (metanol, etanol, acetone) alkalmazása tapasztalatunk alapján jelentősen rontotta a metszetek morfológiáját, megnehezítve ezzel a jelölést és kiértékelést. A szárítást követően a metszeteket fagyasztva tároltuk (-21 °C).

Az immunfluoreszcenciás jelölés első lépéseként a metszeteket 5 percig 1% BSA-t és 0,01% Triton X 100-at tartalmazó HEPES-sel rehidráltuk és permeabilizáltuk. A jelölést 2 µg/ml antitest koncentrációval, 4 °C-on, 10 órás inkubációval végeztük. Minden antitestet 1% BSA-t tartalmazó HEPES pufferben alkalmaztunk.

A HER2-t A488-76.5 antitesttel, az NK-sejteket A647-anti-CD45 antitesttel (CD45.1 klón) jelöltük. A sejtmagokat DAPI-val festettük, 10 µg/ml koncentrációt alkalmazva 2 óra inkubációval, 4 °C-on. A metszeteket háromszor mostuk (5, 20 és 60 perces mosás) 1% BSA-t és 0,01% Triton X 100-at tartalmazó HEPES-sel, majd 1%-os formaldehiddel fixáltuk 10 percig. A metszet fedésekor Mowiol antifade-et használtunk.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

Az immunfluoreszcensen jelölt sejteket és szövettani metszeteket konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (LSM 510, Carl Zeiss GmbH) vizsgáltuk 40-szeres C-Apochromat vízimmerziós objektívvel (NA = 1,2). Az emissziós detektálási tartományokat dikroikus tükör és szűrők (bandpass és longpass) alkalmazásával állítottuk be a 3. táblázatnak megfelelően.

Fluoreszcens festék	Gerjesztési hullámhossz	Emissziós tartomány
DAPI	351 nm	385 – 470 nm
Alexa Fluor 488	488 nm	505 – 550 nm
eGFP	488 nm	505 – 550 nm
Alexa Fluor 546	543 nm	560 – 615 nm
Alexa Fluor 555	543 nm	560 – 615 nm
Alexa Fluor 647	633 nm	650 nm felett (long pass)

3. táblázat. A fluoreszcens festékekhez használt gerjesztési és detektálási hullámhossz-tartományok konfokális mikroszkópos vizsgálatok során

Az *ex vivo* daganatmetszetekről 3 egymás feletti síkban készítettünk 4 µm vastag optikai szeleteket, a szeletek közepeinek egymástól való távolsága 3 µm volt. Bár ezáltal összesen a metszet középső 10 µm-es részéről nyertünk felvételt, 3 db 4 µm vastag optikai szelet előnye 1 db 10 µm vastag szelettel – a hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal – szemben, hogy az egymás felett lévő sejtek nem fednek át, az egyes sejtek könnyebben elkülöníthetőek, ami a kisméretű NK-sejtek észleléséhez nagymértékben hozzájárult.

Az *in vitro* ADCC vizsgálatához az NK-sejtek és a célsejtek által kialakított immunszinapszisok felvételéhez 1,5 µm vastag optikai szeleteket készítettünk.

Statisztikai adatelemzés

A kísérleti eredményeket azok átlagával ± SD vagy SEM értékekkel mutatom be, az ábrán jelölteknek megfelelően. A dózis-hatás görbék elemzéséhez az adatpontokra Hill-egyenletet illesztettünk:

$$y = \min + \frac{(max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{Hillslope}}$$

A pertuzumab és pertuzumab F(ab')₂ dimerizációgátló hatását egyutas ANOVA-val, Holm-Sidak post hoc tesztel vizsgáltuk, α = 0,05 értéken.

A trastuzumab, pertuzumab és kombinációik által kiváltott ADCC hatékonyságának elemzéséhez az adatpontokat minden kísérletben a szaturáló koncentrációkkal elért maximum hatásra normáltuk. Különböző kísérletek összegzéséhez minden kezelési koncentráció kísérletenként normalizált hatását normalizáltuk az átlagolt maximális hatásra, majd átlagoltuk.

Az adott időpontban mért *in vivo* tumorméreteket varianciaanalízisét egyutas ANOVA-val, Tukey-féle post hoc tesztel végeztük, α = 0,05 értéken.

Az daganatok *ex vivo* analízisekor az NK-sejtek tumor-penetrációjának függését a daganatszélről való távolság függvényében „one site competition” függvénnyel illesztettük:

$$y = \min + \frac{(max - \min)}{1 + 10^{x - \log EC_{50}}}$$

mely megegyezik az olyan szigmoid dózis-válasz görbével, ahol a HILL meredekség értéke -1,0.

A statisztikai analízishez SigmaPlot12 (Systat Software, San Jose, CA) és Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA) programokat használtuk.

Eredmények és megbeszélésük

I. Radioaktivitás-mentes, kitapadó célsejtek vizsgálatához optimalizált, *in vitro* ADCC mérési módszer kiválasztása

Az ADCC legalább két sejt – a célsejt és az NK-sejt – interakciója, így az ADCC módszerek egyik legfontosabb kulcseleme a két sejttípus megkülönböztethetősége a kísérlet során.

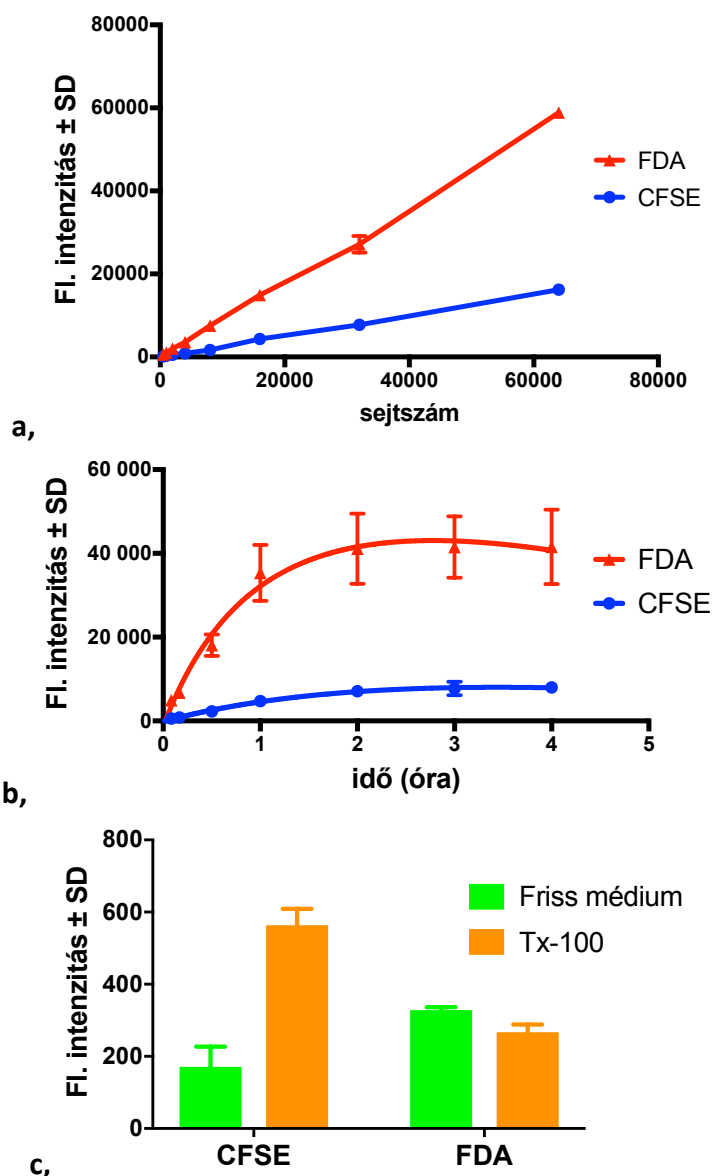
I.1. Fluoreszcens festék felszabadulásán alapuló in vitro ADCC módszer

Az élő JIMT-1 célsejteket fluoreszcein-diacetát (FDA) vagy carboxifluoreszcein szukcimidil észter (CFSE) fluoreszcens festékekkel jelöltük az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak alapján. A 96-lyukú plate-ben többféle sejtdenzitást vizsgálva látható, hogy 24 óra inkubáció után a felülúszóban mért fluoreszcencia intenzitás a FDA és a CFSE esetén is lineárisan arányos a sejtszámmal (13. a, ábra). Mivel a CFSE kovalensen kötődik a citoplazma fehérjéihez, jobban megmarad a sejten belül, a felszabadult fluoreszcens festék intenzitása kisebb, mint a FDA esetén. Ennek ellenére a jelentős mennyiségű spontán felszabadult fluoreszcencia intenzitás minkét festék esetén elfedheti egy ADCC kísérletben az ADCC-kiváltotta célsejt pusztulás miatti felszabadulást.

Ezért megvizsgáltuk a spontán felszabadulás dinamikáját, időfüggését (13. b, ábra). Az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt jelölési protokoll után a 24-lyukú plate-ben lévő jelölt sejtek felülúszójából adott időközönként 100 µl mintát vettünk. A FDA és a CFSE felszabadulás szaturáló görbét mutat az idő függvényében. A felszabadulás a jelölés után 2 illetve 3 óra után éri el a legmagasabb, egyben plató szintet, mely után további nettó felszabadulás már nincs. Annak vizsgálatára, hogy a sejten belül mennyi fluoreszcens festék maradt, amely a későbbiekben felszabadítható lehet, 24 óra múlva, médiumcserét követően, a sejteket TX-100-zal lizáltuk (13. c, ábra). A lizálással a sejtekben maradt összes fluoreszcens festék felszabadításra kerül. A felülúszóban mért fluoreszcencia intenzitás a FDA esetén nem, a CFSE esetén is csak kismértékben emelkedett. Ez alátámasztja, hogy a CFSE kovalens kötődése miatt nagyobb arányban marad a sejten belül, de az emelkedés abszolút értéke a spontán felszabadulás után mért értékekhez képest elhanyagolható (kb. 5%). Ez a jel nem elegendő az ADCC hatékonyságában bekövetkező kismértékű változások detektálásához, illetve a spontán felszabadult festék tovább rontja a detektálás érzékenységét.

A FDA és a CFSE felszabaduláson alapuló teszt tehát modellrendszerünkben nem alkalmas az *in vitro* ADCC vizsgálatára a spontán felszabadulás mértéke, és annak időben elhúzódó volta miatt, mely összemérhető az ADCC vizsgálat időtartamával.

Bár a CFSE jelölt sejtekben maradt fluoreszcens festék mennyisége felülúszóban történő méréshez kevés, a sejten belül maradt CFSE sejtenkénti méréshez, és ezáltal a célsejtek azonosításához elegendőnek tűnik.



13. ábra. Fluoreszcens festék felszabadulásán alapuló teszt

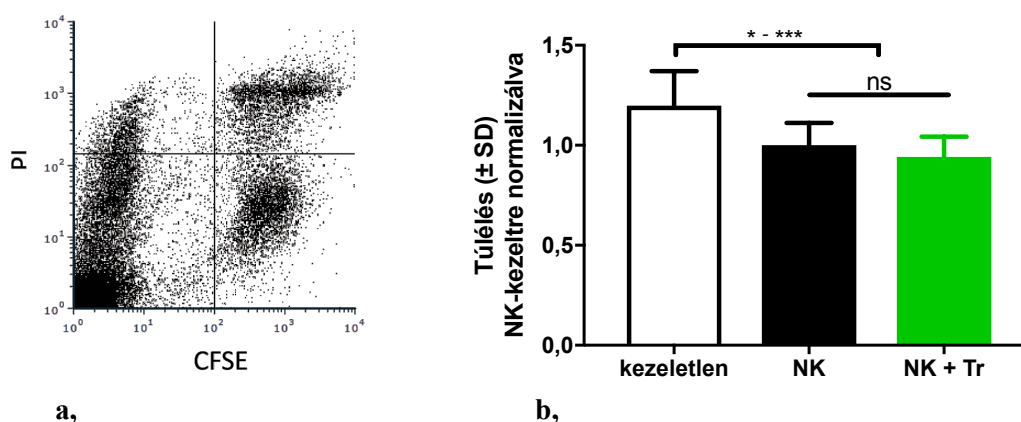
a, A FDA és CFSE fluoreszcens festékek spontán felszabadulása korrelál a sejtszámmal. Az adatpontok 4 független kísérlet eredményeiből, kísérletenként sejtszámonként 5 lyuk átlagai ± SD.

b, A spontán felszabadulás időbeni vizsgálata közvetlenül a FDA és CFSE jelölés után. Az adatpontok 5 lyuk átlagai ± SD.

c, A 24 óra után is a célsejtben maradt fluoreszcens festék felszabadítása lizálással. Az adatpontok 5 lyuk átlagai ± SD

1.2. Áramlási citometriás ADCC mérés CFSE és propidium jodid alkalmazásával

Az intracellulárisan stabilabban megmaradó CFSE alkalmas lehet a megjelölt célsejtek a jelöletlen ölő sejtektől történő elkülönítésére áramlási citometriás mérés során. Az elpusztult, vagy pusztulóban lévő sejtek propidium jodid felvétele a CFSE-vel jelölt JIMT-1 célsejtek és az NK-sejtek elkülönítésével párhuzamosan lehetővé teszi, hogy a kevert sejt mintából négy alcsoportot különíthessünk el (14. ábra). A legkisebb spektrális átfedést az FL1 (CFSE) és FL3 (PI) csatornákkal tapasztaltuk a FACSCalibur áramlási citométeren.



14. ábra. Áramlási citometriás ADCC mérés CFSE / PI módszerrel.

a, Jelöletlen NK-sejtet, és CFSE-jelölt JIMT-1 sejtet tartalmazó minták propidium jodid jelölés után. Reprezentatív dot plot diagram. Effektor / célsejt arány 5:1, kezelés 10 µg/ml trastuzumab, 5 óra inkubáció. A CFSE-vel jelölt JIMT-1 célsejtek a jelöletlen NK-sejtektől a CFSE (FL1) csatornában elkülöníthetők. A propidium jodiddal jelölődő sejteket elpusztult, vagy pusztulóban lévő sejtekként definiáljuk.

b, A kezelés után a célsejtek túlélési arányát a CFSE-jelölt sejtek PI-negatív / összes sejt aránya adja (± SD). A túlélési arányt minden mintánál a kizárólag NK-sejtes kezelést kapott mintákban mért túlélési arányra normalizáltuk (*: p = 0,012; ***: p = 0,001; ns: p = 0,51).

A propidium-jodid felvételi teszt során az NK sejtek szignifikánsan csökkentették a JIMT-1 sejtek túlélését a kezeletlen kontrollhoz képest, antitest hozzáadása nélkül is. A trastuzumabot a rendszerhez adva a célsejtek túlélése nem csökkent szignifikánsan tovább (14. b, ábra).

Annak hátterében, hogy a módszer miért nem képes az NK-sejtes és az NK+Tr kezelt minta között különbséget tenni, több faktor is állhat. Lehetséges, hogy a szolid tumorból származó letapadva növvő JIMT-1 célsejtek érzékenysége az NK-sejtekre fokozódik a hosszú idejű (több órás) szuszpenzióban tartás során. Egyúttal az is felmerül, hogy az ADCC következtében lefragmentálódott sejteket elveszítjük a PI-pozitív populációból. Az NK-target sejt arány, valamint a behatási idő változtatása nem befolyásolta érdemben az NK és NK + trastuzumab kezelés megkülönböztethetőségét. Így összességében elmondhatjuk, hogy a PI/CFSE jelölést alkalmazó áramlási citometriás módszer nem elég specifikus az antitest hatás kvantitálásához, és nagyban befolyásolja a kísérlet kimenetelét, hogy az adherensen növvő sejteket hosszabb ideig feltripszinezett állapotban kell tartani. A következőkben az ADCC letális folyamatára specifikusabb (I.3), illetve a letapadó sejtek számára kevesebb nem-specifikus stresszel járó módszereket teszteltünk (I.4).

I.3. ADCC vizsgálata a specifikusan ADCC által kiváltott intracelluláris folyamatok detektálásával

A specifikusan az NK-sejtek által az ADCC során kifejtett „halálos csapás” kimutatásához olyan módszert kerestünk, amely specifikusan az ADCC során a célsejtben kiváltott enzimaktiválódások kimutatásán alapult. A PanToxiLux™ teszt szubsztrátja mind a granzim B, mind attól „upstream” kaspázok aktivitását kimutatja.

A TFL4 jelölés a CFSE-hez hasonlóan hatékonyan bizonyult a célsejtek és az NK-sejtek áramlási citometriás elkülönítésében. A célsejtekhez adott NK-sejtek már antitestek jelenléte nélkül is szignifikánsan növelték a „halálos csapás”-t kapott sejtek arányát a kezeletlen kontrollhoz képest, a túlélés csökkent ($p = 0,013$), ez az eredmény megegyezett a CFSE/PI módszerrel mérttel (ahol $p = 0,012$ volt) (4. táblázat). A PanToxiLux módszerrel viszont kimutatható volt, hogy az NK-sejtek antitest jelenlétében nagyobb arányban pusztították a célsejteket, a csupán NK-sejtekkel kezelt mintákhoz képest a túlélés jelentősen csökkent ($p < 0,0001$). PI/CFSE módszerrel ez nem volt kimutatható ($p = 0,516$).

Mivel a PanToxiLux szubsztrát specifikus enzimaktiválódásokat mutat ki, lehetőség volt a kísérlet kezdetén már elpusztult sejtek megjelölésére azok aspecifikus membrán permeabilitása alapján jelölő NFL1 fluoreszcens molekulával, mely lehetővé teszi a

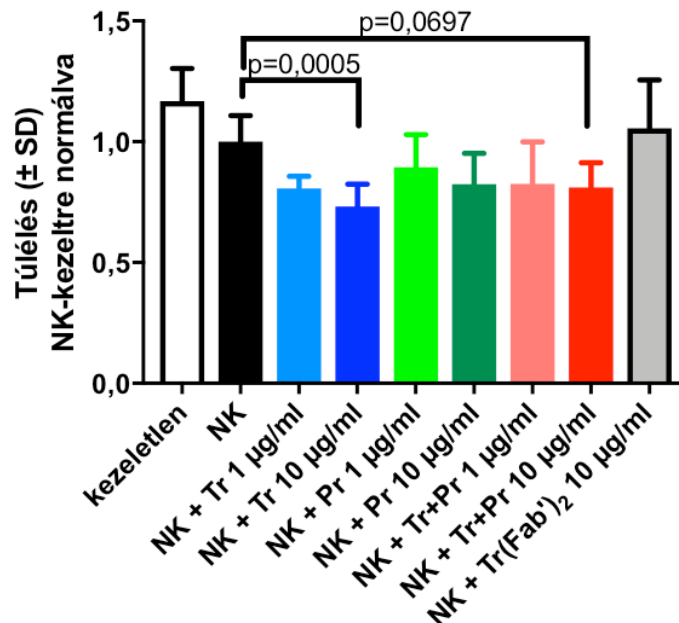
kiértékeléskor a kísérlet kezdetén már elpusztult sejtek kizárását, így a kísérleti eredmények további pontosítását.

ÖSSZEHASONLÍTÁS	CFSE/PI	PANTOXILUX	IMPEDANCIA
KEZELETLEN VS NK	0,012	0,013	0,196
KEZELETLEN VS NK+TR	0,001	< 0,0001	< 0,0001
NK VS NK+TR	0,516	< 0,0001	< 0,0001

4. táblázat. A detektált túlélési arányok közötti eltérés a három fő kezelési csoport között PI/CFSE, PanToxiLux és impedancia alapú sejtanalizátor módszerekkel mérve.

Az értékek a 14., 15. és 16. ábrák adataiból az egymásnak megfeleltethető, kontroll, NK, és NK + 10 µg/ml trastuzumab kezelésekből számolt statisztikai analízis eredményei. ANOVA varianciaanalízis után Tukey-féle tesztet végeztünk. A $p < 0,05$ szignifikancia értékek félkövérrel kiemelve.

Mindezek mellett a kísérletek ismételése során azt tapasztaltuk, hogy az NK-sejtek alapaktivitása (antitest nélküli ölési képessége) és az antitest kezelések hatékonysága kísérletenként jelentősen változott, nagy szórást mutatott. Ha valamennyi kezelt csoportot összehasonlítjuk, azt találjuk, hogy közülük csak az NK-sejtekkel együtt 10 µg/ml koncentrációban adott trastuzumab csökkentette szignifikánsan a célsejtek túlélését az NK-kezelt kontrollhoz képest ($p = 0,0005$ 15. ábra). A 10 µg/ml trastuzumab mellett az 1 µg/ml trastuzumab és 1 µg/ml trastuzumab+pertuzumab kezelések is majdnem elérték a kijelölt $p = 0,05$ küszöböt. Harmadik kontrollként a trastuzumab F(ab')₂ antitest fragmentummal együtt adva az NK-sejteket megerősítettük, hogy (1) az Fc rész nélkül az antitestek ADCC-t nem mediálnak, (2) az antitestek nem gátolják az NK-sejtek alapaktivitását.



15. ábra. *In vitro* ADCC PanToxiLux módszerrel mérve.

A túlélési arány a szubsztrát negatív célsejt és összes célsejt arányát jelenti, és minden mintát a kizárólag NK-val kezelt mintára normalizáltunk. Az értékek 7-11 független kísérlet átlagai. Valamennyi feltüntetett kezelést egyutas ANOVA-val, Tukey-féle teszttel hasonlítottuk össze.

Elmondhatjuk, hogy a PanToxiLux „kit” alkalmazásával lehetőségünk volt összehasonlítani két antitest hatékonyságát az ADCC mediálásában (15. ábra). A trastuzumab ADCC mediálásában potensebb volt, mint a pertuzumab, de a trastuzumab és pertuzumab együttes adásának hatékonysága a trastuzumabéhoz hasonló volt. Az egyes minták közötti különbségek összehasonlítását azonban a számottevő szórás nem segíti elő.

A PanToxiLux módszernek az ezt megelőző módszerekhez hasonlóan hátránya, hogy a sejtek hosszú ideig szuszpenzióban vannak az előkezelés (TFL4, és NFL1 jelölés) és a kísérlet időtartama alatt. A kontroll minta NFL1 pozitív sejtjeinek magas arányából (~10%) látszik az is, hogy a JIMT-1 célsejtek feltripszinezése és szuszpenzióban tartása az életképességet jelentősen csökkenti. A szuszpenzióban tartás a sejtmembrán és citoskeleton megváltoztatásával az NK-sejt – célsejt interakciót is befolyásolhatja.

I.4. Sejtadhézió impedancia-alapú mérése ADCC valós idejű követésére

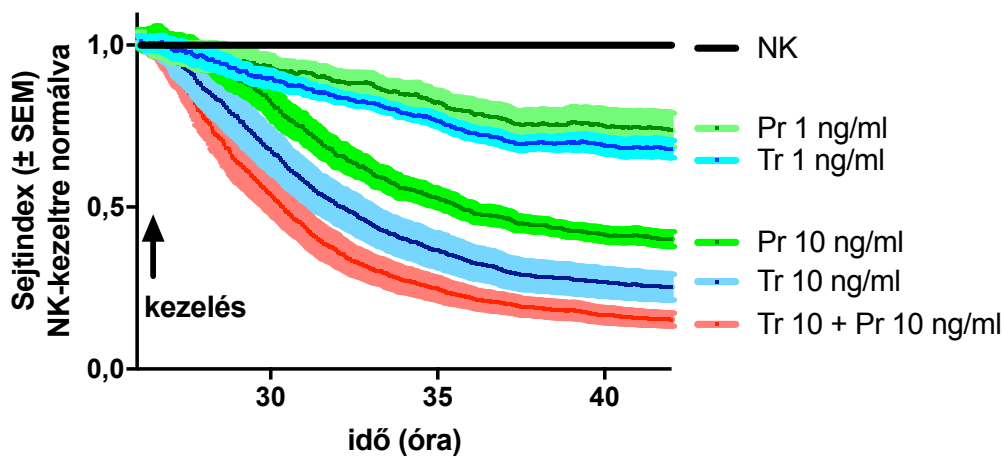
Az impedancia alapú sejtanalizátorral mért ohmikus ellenállás értékek az idő függvényében valós időben mutatják, hogy a kezelés után az ellenállás csökken (12. ábra a módszereknél és 16. a, ábra), aminek háttérében az NK-sejtek általi célsejt-pusztítás áll. A méréseket ECIS Z Θ sejtanalizátoron mértük.

A dózis-kalibrációs kísérletek alapján kiderült, hogy a jelen kísérleti elrendezésben a korábban alkalmazott 1 és 10 $\mu\text{g/ml}$ antitest koncentrációk már szaturáló értékek az ADCC mediálásában, így a dózisfüggést az 1-100 ng/ml tartományban is megvizsgáltuk (16. ábra). Az ADCC hatékonyságában a dózisfüggő különbségek az 1-20 ng/ml tartományban mutatkoztak leglátványosabban, a 100 ng/ml dózisok már telítették az ADCC-t.

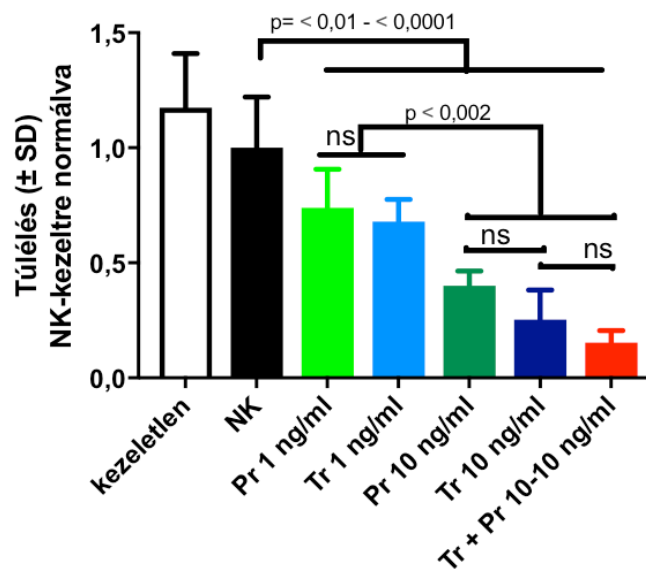
A normalizált sejtindex görbék végpontjai a túlélő célsejtek arányát demonstrálják (16. b, ábra). A kezeletlenhez képest a csak-NK kezelés nem csökkentette szignifikánsan a túlélést ($p = 0,34$), így korábbi módszerekkel összehasonlítva a jelenlegi módszerben befolyásolja legkevésbé az NK-sejtek alapaktivitása a célsejteket. Ezzel szemben a csak-NK-hoz képest, az NK mellett adott trastuzumab és pertuzumab antitest kezelések mind 1 ng/ml, mind 10 ng/ml koncentrációban jelentősen csökkentették a túlélést ($p < 0,01$). Az eltérő antitest koncentrációk között is kimutatható szignifikáns különbség ($p < 0,02$), a két különböző antitest hatékonysága statisztikailag hasonlóan mutatkozott, de az eredményekből az is látható, hogy a trastuzumab konzekvensen némileg hatékonyabban mediálja az ADCC-t, mint a pertuzumab, mind 1 ng/ml, mind 10 ng/ml koncentrációban.

Az impedancia alapú sejtadhézió mérés tehát a többi vizsgált módszerrel nem detektálható különbségeket is kimutat, sőt, pontosan kvantitál, ugyanakkor ezen mérési módszerben befolyásolta az NK-sejtek alapaktivitása legkisebb mértékben a célsejtek túlélését.

Ezek miatt az impedancia alapú mérést választottuk további, az antitestek hatásmechanizmusának és farmakodinamikájának megismerését célzó *in vitro* ADCC kísérleteinkhez.



a,



b,

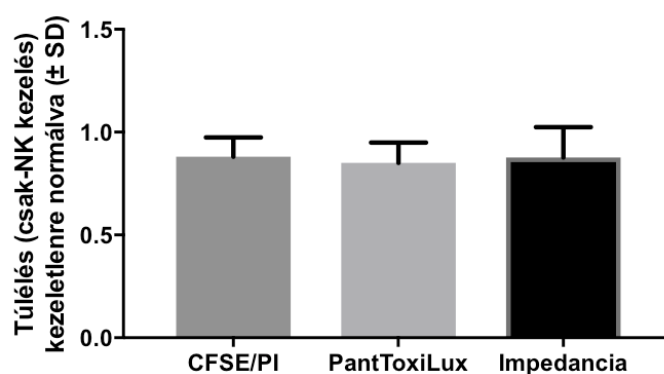
16. ábra. ADCC vizsgálata impedancia alapú sejtanalizátorral. NK : célsejt arány 2,5:1.

a, A 3 perces időközönként 4000 Hz-en mért ohmikus ellenállásból származtatott normalizált sejtindex értékek az idő függvényében. A kezelés a kísérlet 24. órájában, a mért ohmikus ellenállás plató fázisában kezdődött, az ábra csak a kezelés utáni időszakot mutatja. Mindegyik görbe legalább 3 független kísérlet, és kísérletenként legalább 2 lyuk eredményeinek átlaga. A sáv közepén húzódó (sötétebb) vonal mutatja az átlagot, az ennek mentén futó világosabb sáv jelentése: $\pm$ SEM.

b, Az a, ábra görbéinek végpont értékeit demonstráló oszlopdiagram ($\pm$ SD). ns: nem szignifikáns. A jelzett p szignifikancia szinteknél az összehasonlított csoportoknál az egyik csoport (pl. Pr 1 ng/ml és Tr 1 ng/ml) minden tagja legalább $p < 0,01$ (vagy akár $p < 0,001$) szignifikancia szinten is eltér a másik csoport (pl. Pr 10 ng/ml, Tr 10 ng/ml, Tr + Pr 10-10 ng/ml) bármelyik tagjától.

1.5. NK alapaktivitás PI/CFSE, PanToxiLux és impedancia-alapú mérések során

Az előbbieken az ADCC mértékét az NK alapaktivásra normálva mutattuk be. Ugyanakkor célszerűnek látszik összehasonlítani az egyes módszerekkel mérhető NK alapaktivításokat is az összes mért adat alapján. A csak-NK kezelt célsejtek túlélési adatait az azonos kísérlet kezeletlen mintáira normalizáltuk, majd átlagoltuk (17. ábra). Az NK-sejtek alapaktivitása a mérési módszertől függetlenül azonos volt ($p \geq 0,85$) mindhárom módszerben, tehát feltehetőleg nem az egyes módszerek miatt mutatkozó különbségek okozzák, hogy az antitest jelenlétét, ill. eltérő koncentrációt nem minden mérésfajtaival lehet detektálni. Ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy az NK alapaktivitás miatti sejtpusztulás az egyes módszereknél különböző behatási idők után került kvantitálásra, és a szuszpenziós módszerek esetén azonos mértékű sejtpusztulás lényegesen rövidebb idő alatt jelentkezett. Az NK alapaktivítások nem elhanyagolható SD-je azt is mutatja, hogy az aktivitások jelentősen eltérhetnek az egyes kísérletekben, így mindig az aktuális csak-NK mintára történő normalizálás javasolható, mint „kontroll”.



17. ábra. NK-sejtek alapaktivitása miatti citotoxikus hatás

Az egyes kísérletekben NK sejtek mellett mért túlélést a kezeletlen kontroll túlélésére normalizáltuk, majd a hányadosokat átlagoltuk.

II.

Anti-HER2 antitestek hatásmechanizmusának és hatékonyságának vizsgálata

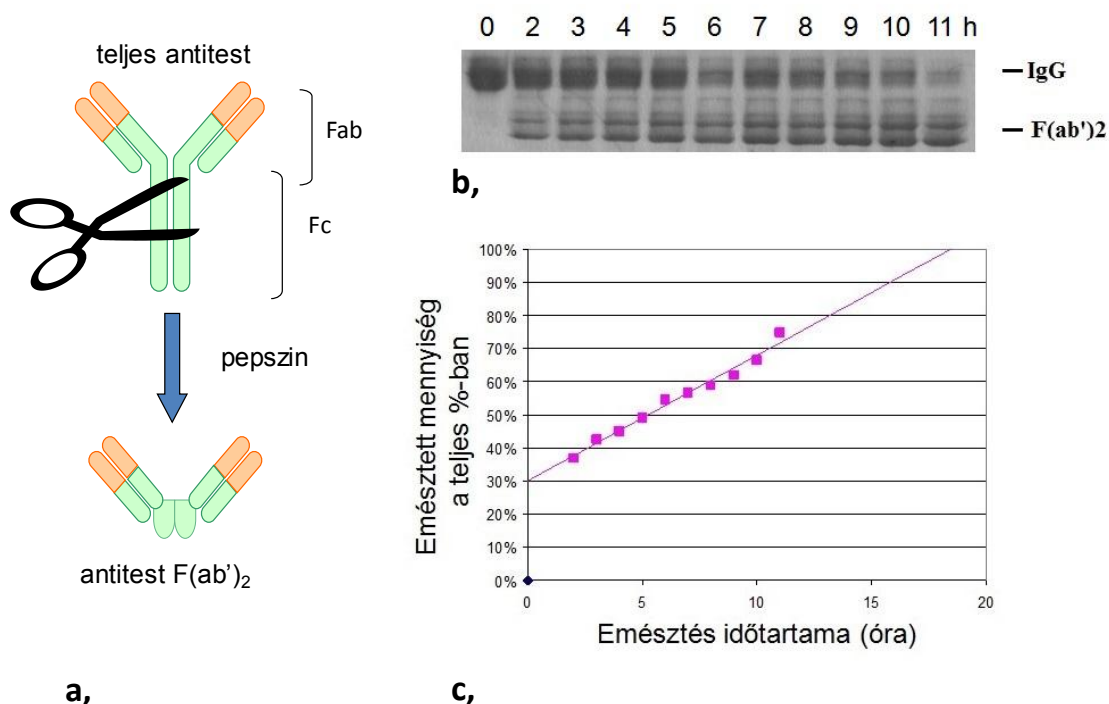
A trastuzumab és pertuzumab antitestek hatásmechanizmusának egyik eleme az antitestfüggő sejtes citotoxicitás kiváltása, ugyanakkor számos sejtre fejtenek ki közvetlen biológiai hatást. Az ADCC hatás elkülönítéséhez szükség volt a teljes trastuzumab és pertuzumab antitestek mellett azok Fc rész nélküli – azaz az Fc által kiváltott hatásmechanizmusoktól mentes – fragmentumaikra. Bár az Fc résztől mentesek az Fab és a $F(ab')_2$ fragmentum változatok is, számunkra az $F(ab')_2$ fragmentumok voltak szükségesek, ugyanis közvetlen biológiai hatásprofiljukban legközelebb állnak a teljes antitesthez, mivel bivalens fragmentumok lévén a receptorok keresztkötésére is képesek. Erre az Fab fragmentumok nem képesek.

A kereskedelmi forgalomban csak a teljes IgG trastuzumab és pertuzumab antitestek érhetőek el, ezért ezekből kiindulva volt szükség az $F(ab')_2$ fragmentumok előállítására az állatkísérletekhez szükséges nagy mennyiségben.

$F(ab')_2$ fragmentumok előállítása

A teljes antitestekről az Fc részt agaróz gyöngyhöz kötött pepszines emésztéssel távolítottuk el, az emésztési folyamat optimalizálása során a pepszin-antitest keverékből 1 óras időközönként vettünk mintát. Az emésztést Tris-sósavval állítottuk le. Az emésztett keverék összetételét nem-redukáló SDS gélelektroforézissel vizsgáltuk (18.b ábra). Az emésztés időtartamának megfelelően a felső, teljes IgG-t tartalmazó sáv intenzitása az idővel arányosan csökken, a keletkezett kisebb molekulásúlyú $F(ab')_2$ fragmentumokat tartalmazó alsó sáv intenzitása nő. A sávok integrált denzitásából kiszámítottuk az egész antitest és a $F(ab')_2$ közelítő moláris mennyiségét, és ezekből az egyes időpontokhoz rendelhető százalékos emésztettséget (18.c, ábra).

A túl hosszú emésztési időtartam az antitestek túlzott fragmentálódásához, sérüléséhez vezetett, míg a rövidebb időtartam sok emésztetlen Ig-t eredményez. Ideális emésztési időtartamnak a 16 órát választottuk.



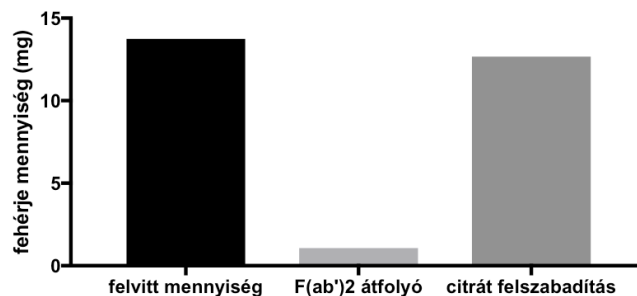
18. ábra. F(ab')₂ előállítása pepszines emésztéssel

a, A trastuzumab IgG pepszines hasítása 37 °C-on.

b, A trastuzumab emésztési folyamatának optimalizációja során a pepszin-antitest keverékből 1 órás időközönként kivett mintákból készült SDS gélelektroforézis eredménye.

c, A sávok integrált denzitásából számított egész antitest és a F(ab')₂ fragmentum

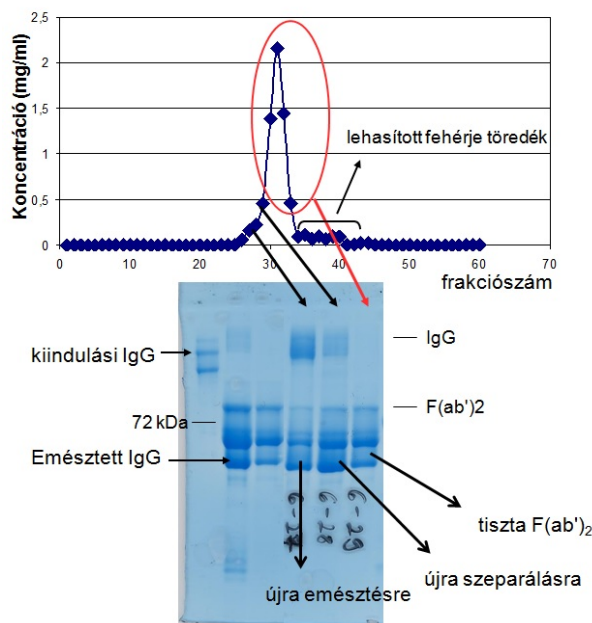
Az antitest tisztításhoz és a teljes antitestek és az Fab fragmentumok elválasztásához az irodalomban agaróz vagy Sepharose gyöngyhöz kötött protein A vagy protein G javasolt, amely az antitest Fc részét megköti, így a keverék könnyen szeparálható (75). Az F(ab')₂ fragmentumok számára viszont nem voltak alkalmasak, mert az emésztett F(ab')₂ fragmentumnak még megmarad némi affinitása az oszlophoz, így a felvitt mennyiségnek csak töredékét kaptuk vissza (19. ábra).



19. ábra. A trastuzumab IgG és F(ab')₂ szeparálása protein A oszlopon

Az 18. ábrán bemutatott 11 óráig emésztett, 75%-ban F(ab')₂-t tartalmazó minta nagy része kötődött az oszlopon, és csak citrát elúcióval lehetett visszanyerni.

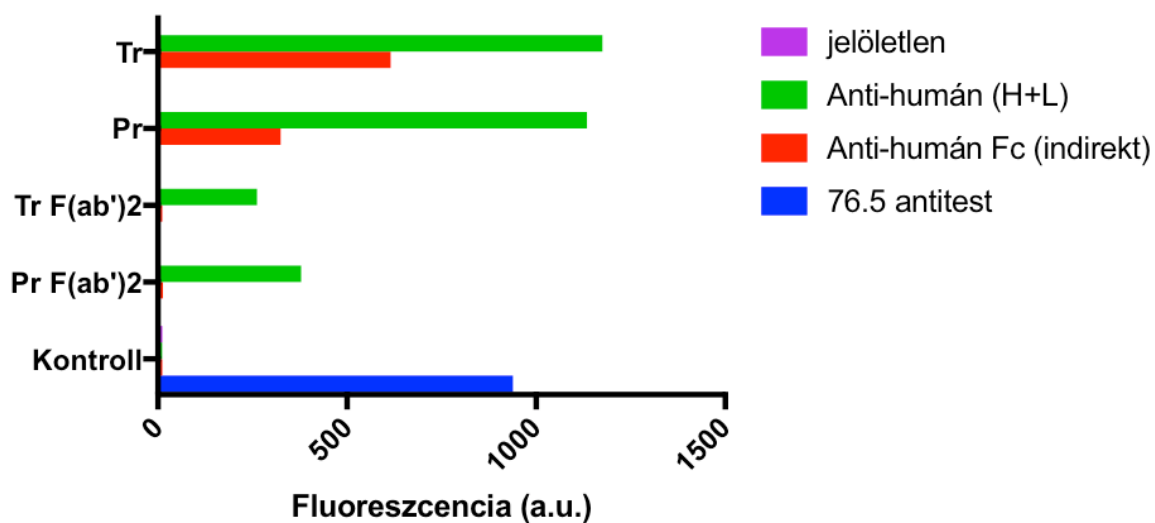
Emiatt a megfelelő méretű fragmentumok szeparálására méretre és ionerősségre optimalizált gélszűrést használtunk. Trastuzumab esetén a Sephacryl S300 gyantával töltött oszlop mutatkozott leghatékonyabbnak. A módszer részletes leírását az „Anyagok és módszerek” fejezet tartalmazza. A nagy mennyiségű IgG-t tartalmazó frakciókat újra emésztettük, a kisebb IgG tartalmúakat koncentráció után újra futtattuk, a tiszta F(ab')₂-t tartalmazókat pedig töményítve és sterilre szűrve 4 °C-on tároltuk a kísérletekhez (20 ábra). A 18., 19. és 20. ábrák a trastuzumab IgG antitesttel végzett emésztési folyamat eredményei. A pertuzumab emésztése és a pertuzumab F(ab')₂ szeparálása a trastuzumabéhoz hasonlóan zajlott, de a szeparálást Superdex 200 gyantával töltött oszlopon végeztük, amelyen a teljes antitest, az F(ab')₂ fragmentumok, és a kisebb fragmentumok jobban elváltak.



20. ábra. A trastuzumab IgG és F(ab')₂ fragmentumok elválasztása géliszűrőssel

A frakciók összetételét nem-redukáló SDS gél elektroforézist követő Coomassie BB festéssel vizsgáltuk.

A vizsgált antitestek és alegységeik felhasználása előtt meg kellett bizonyosodnunk, hogy a várt antitest F(ab')₂ fragmentumokat kaptuk-e meg. SKBR-3 sejtek sejtfelszíni HER2 molekuláit jelöltük az intakt IgG és az F(ab')₂ fragmentumokkal, indirekt immunfluoreszcenciával, áramlási citometriás méréssel (21. ábra). A hisztogram átlagértékei alapján a háttér intenzitásokhoz képest sem a trastuzumab, sem a pertuzumab F(ab')₂ fragmentumokon nem jelölődött az Fc rész, míg a teljes IgG antitestek Fc része jelölhető volt. Az F(ab')₂ fragmentumok jelenlétét a könnyű és nehéz láncot is felismerő A488-anti-humán (H+L) másodlagos poliklonális antitesttel igazoltuk, mely az egész antitesteket is jól jelölte. Az SKBR3 sejtek HER2 pozitivitását direkt jelölt, a HER2-t más epitópon felismerő 76.5 jelű antitesttel igazoltuk.

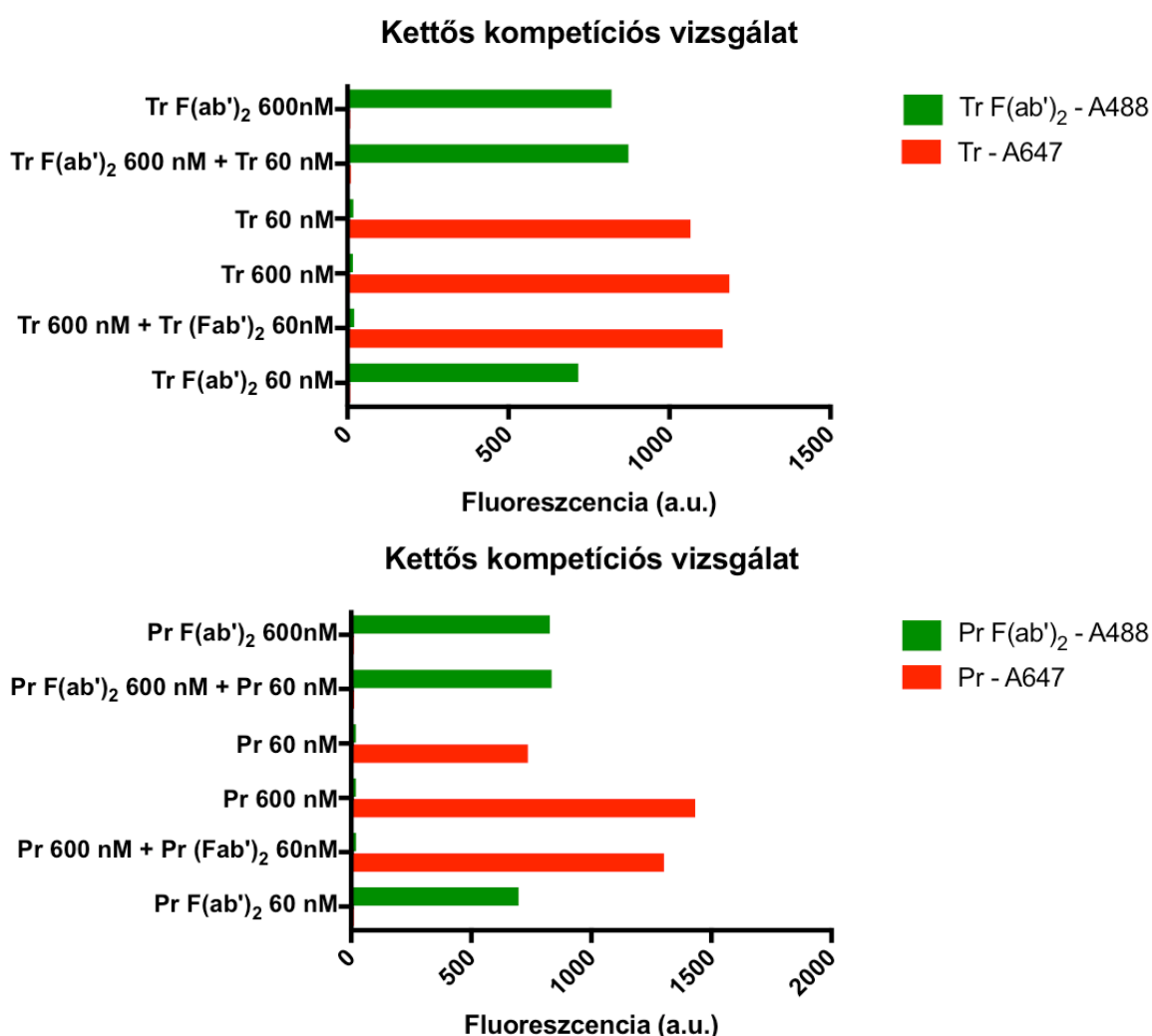


21. ábra. Trastuzumab és pertuzumab, valamint F(ab')₂ fragmentumaik kötődése sejtfelszíni HER2 molekulákhoz, és Fc részük jelölhetősége

A HER2 molekulák immunfluoreszcenciás jelölése SKBR-3 sejteken történt, a sávok az áramlási citometriás eloszláshisztogramok median értékét mutatják.

Tr: trastuzumab; Pr: pertuzumab; anti-humán Fc = Fc fragmentum elleni antitest; anti-humán (H+L) = könnyű és nehéz lánc elleni, direkt jelölt antitest.

A kiindulási antitestek, illetve $F(ab')_2$ fragmentumaik specifikus antigén felismerő tulajdonságainak összehasonlítását kompetíciós vizsgálattal végeztük (22. ábra). SKBR-3 sejtek HER2 molekuláinak direkt immunfluoreszcenciás jelölését végeztük. A trastuzumab $F(ab')_2$ fragmentumával tízszeres feleslegben végzett jelölés után a trastuzumab IgG telítő koncentrációban 10 perc alatt nem tudott kötődni a HER2-höz, nem tudta leszorítani saját $F(ab')_2$ fragmentumát. Fordítva, az először felkötődő IgG után az $F(ab')_2$ nem jelölt. A vizsgálatot a pertuzumab antitestekkel is elvégeztük.

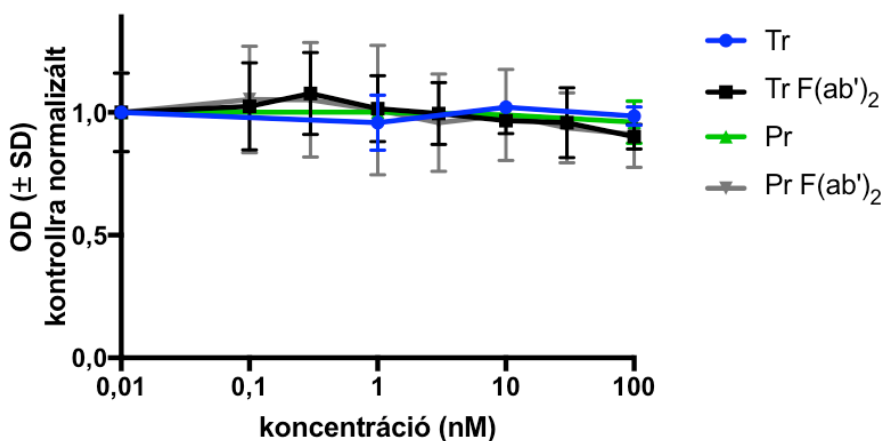


22. ábra. Az egész antitestek és $F(ab')_2$ fragmentumaik affinitásának tesztelése kompetícióval

SKBR-3 sejtek HER2 molekuláit a feltüntetett koncentrációjú, Alexa Fluor 488 és Alexa Fluor 647 festékekkel direkt konjugált antitesttel jelöltük szekvenciálisan. A sávok az áramlási citometriás eloszláshisztogramok median értékét mutatják. Tr: trastuzumab, Pr: pertuzumab

***In vitro* proliferációs vizsgálatok**

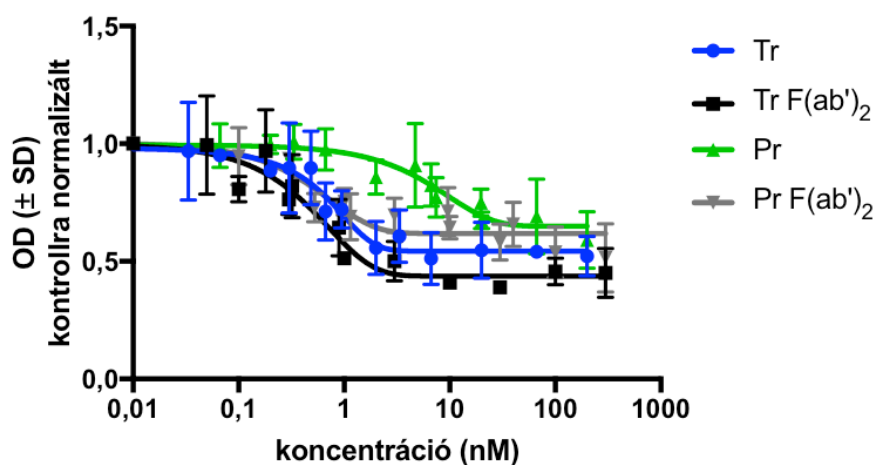
Az antitest kezelések *in vitro* proliferációra gyakorolt hatását ismerten eltérő érzékenyséű sejtvonalakon, MTT alapú módszerrel vizsgáltuk, 3 napos kezeléseket alkalmazva. A teljes antitestek esetén a JIMT-1 sejtek ismert trastuzumab rezisztenciájának megfelelő eredményt kaptuk (23. ábra), a sejtek *in vitro* proliferációját sem a trastuzumab sem a pertuzumab nem gátolta. Az Fc rész eltávolítása nem okozott számottevő változást. Ez egyrészt alátámasztja, hogy az F(ab')₂ készítése során nem került sejtnövekedést befolyásoló anyag a készítménybe, másrészt látjuk, hogy a JIMT-1 sejtek intrinsic rezisztenciája a kisebb F(ab')₂ antitest fragmentumok esetén is fennáll.



23. ábra. A trastuzumab és pertuzumab, valamint F(ab')₂ fragmentumaik hatása ismerten trastuzumab rezisztens sejtek *in vitro* proliferációjára

Az antitestek proliferációgátló hatását MTT alapú teszttel vizsgáltuk trastuzumabra rezisztens JIMT-1 sejteken. Minden pont ≥ 3 független kísérlet átlaga a kezeletlen kontrollra normálva $\pm$ SD.

A trastuzumabra érzékeny BT-474 sejtvonal esetén az egész trastuzumab és $F(ab')_2$ fragmentuma a proliferációt hasonló mértékben csökkentette, félmaximális hatékony koncentrációjuk nem különbözik ($EC_{50\ Tr} = 0,5\ nM$, ill. $EC_{50\ Tr\ F(ab')_2} = 0,8\ nM$, $SEM = 0,1$) (24. ábra). A pertuzumab IgG a trastuzumabhoz képest kevésbé volt hatékony ($EC_{50\ Pr\ F(ab')_2} = 7,2\ nM$, $SEM = 2,2$), viszont a belőle előállított $F(ab')_2$ egy nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyult, félhatékony koncentrációja huszadára csökkent ($EC_{50\ Pr} = 0,4\ nM$, $SEM = 0,1$) (24. ábra).



24. ábra. A trastuzumab és pertuzumab, valamint $F(ab')_2$ fragmentumaik hatása az *in vitro* sejtproliferációra

Az antitestek proliferációgátló hatását MTT alapú teszttel vizsgáltuk trastuzumabra érzékeny BT-474 sejteken. Minden pont ≥ 3 független kísérlet átlaga a kezeletlen kontrollra normálva $\pm SD$. A kezelések félhatékony dózisát a mérési pontokra illesztett dózis-hatás görbe alapján határoztuk meg.

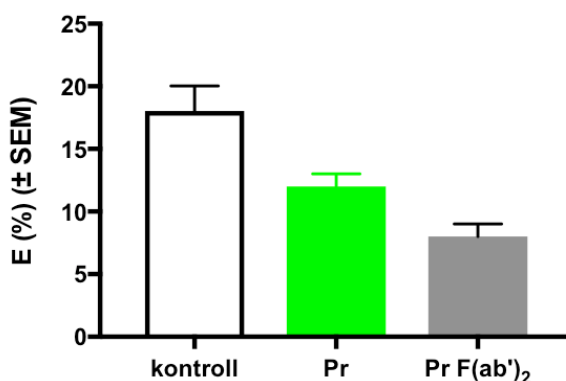
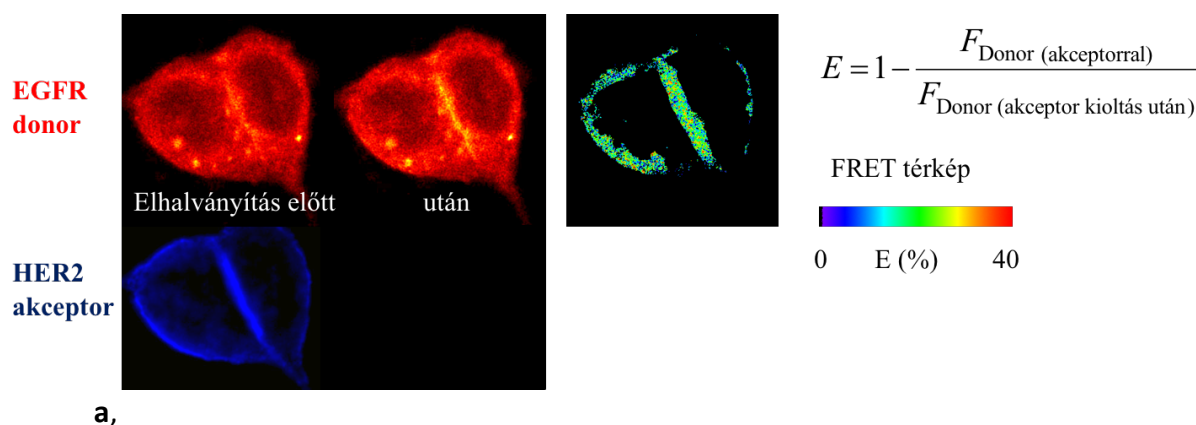
HER2 heterodimerizáció vizsgálata FRET-tel

A pertuzumab $F(ab')_2$ nagyobb hatékonyságának magyarázata lehet, hogy a kisebb $F(ab')_2$ hatékonyabban tölti be a pertuzumab eredeti funkcióját, a HER2 dimerizációjának gátlását. A dimerizáció mértékének vizsgálatához mikroszkópos akceptor fotokioztásos Förster (fluoreszcencia) rezonancia energiatranszfer módszert alkalmaztunk. A BT-474 sejteken a HER2 mellett az EGFR található meg nagy számban a HER család tagjai közül, és méréseink szerint ezeken sejteken az EGFR és HER2 heteroasszociációja jelentős.

Megvizsgáltuk, hogy az $F(ab')_2$ és az egész antitest mennyire képes az EGFR-HER2 heteroasszociációt megbontani.

Az EGFR-HER2 heterodimerizációt a pertuzumab kezelés némileg, a pertuzumab $F(ab')_2$ viszont kifejezetten csökkentette (25. ábra).

A pertuzumab dimerizációt gátló hatása a HER2 dimerizációs karjához való kötődésével magyarázható. Az Fc rész nélküli forma, az F(ab')₂, valószínűleg a kisebb mérete miatt kedvezőbb szterikus feltételekkel hatékonyabban gátolja meg a dimerizációt illetve bontja meg a már kialakult EGFR-HER2 dimereket, és ez a mechanizmus magyarázhatja a pertuzumab F(ab')₂ hatékonyabb *in vitro* proliferációt gátló hatását.



25. ábra. A pertuzumab és pertuzumab F(ab')₂ EGFR-HER2 dimerizációt gátló hatása

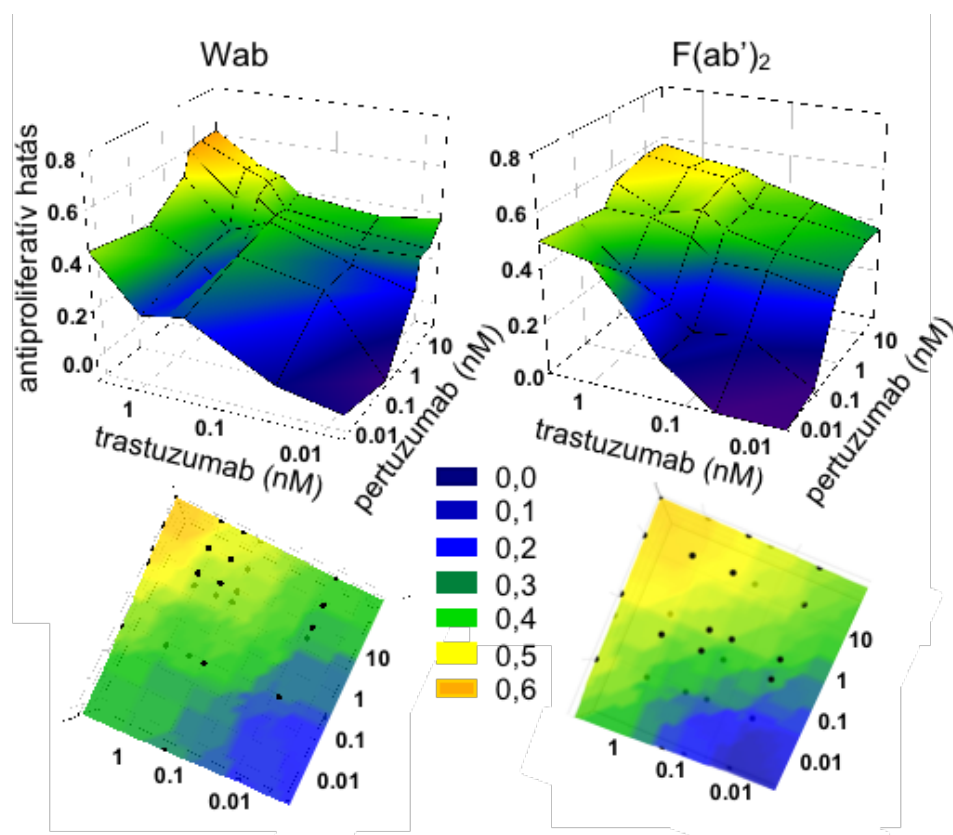
a, Az energiatranszfer térképet akceptor fotoelhalványításos módszerrel nyertük. A donor molekula fluoreszcencia intenzitása nőtt az akceptor kiégetése után (felső két felvétel). Az akceptor molekula fluoreszcenciája a kiégetés után megszűnt (alsó két felvétel). Jobboldalt az ezen felvételekből számított FRET hatásfok színekódolt képe látható.

b, A FRET térképből számított átlagos FRET hatásfokot a pertuzumab F(ab')₂ szignifikánsan csökkenti a kontrollhoz és a pertuzumab kezeléshez képest is ($p < 0,05$).

A kombinált antitest kezelés hatása az *in vitro* sejtproliferációra

A teljes antitesteket és F(ab')₂ fragmentumaikat kombinációban alkalmazva is megvizsgáltuk proliferációra kifejtett *in vitro* hatásukat. A JIMT-1 sejtek esetén, hasonlóan az önállóan alkalmazott antitestekhez, sem az egész antitestek, sem F(ab')₂ fragmentumaik kombinációja nem csökkentette a proliferációt, a sejtvonal intrinszc rezisztenciája érvényesült.

Az antitest-terápiára érzékeny BT-474 sejteken a kombinált kezeléseket részletes dózisfüggésben vizsgáltuk (26. ábra). Az alkalmazott (logaritmusos) dózistartományok szimmetrikusan helyezkedtek el a 25. ábra eredményeiből meghatározott félhatékony dózisok körül. Mind az IgG, mind az $F(ab')_2$ kezelések során a két antitest kombinációjának alkalmazásával az önállóan alkalmazott antitest maximális gátlásánál erősebb hatás volt elérhető. Az azonos gátlást kifejtő kombinációkat megjelenítő – azonos színű – izoból sávok egyenesen húzódnak a két (önálló kezelést jelentő) végpont között, tehát a kombinációs hatás additív, de nem szinergista.



26. ábra. A kombinációs kezelések hatása a BT-474 sejtek proliferációjára

A függőleges tengelyen a kezelések okozta relatív proliferációgátlást ábrázoltuk, azaz, hogy milyen arányban csökkent a proliferáció a kezeletlen kontrollhoz képest. Az x és y tengelyeken az alkalmazott trastuzumab és pertuzumab illetve $F(ab')_2$ fragmentumaik koncentrációja látható. Az alsó ábrák a felső, mérési adatokat megjelenítő ábrákból készült 3 dimenziós simított diagramok felülnézeti képei.

A fekete pontok a mérési pontokat jelentik, melyek közül a 3D ábrákon a színes diagramsík az alatta lévő pontokat eltakarja. A 2D felülnézeti képen – az eltérő síkok miatt eltérő kontraszttal – az összes mérési pont kivehető.

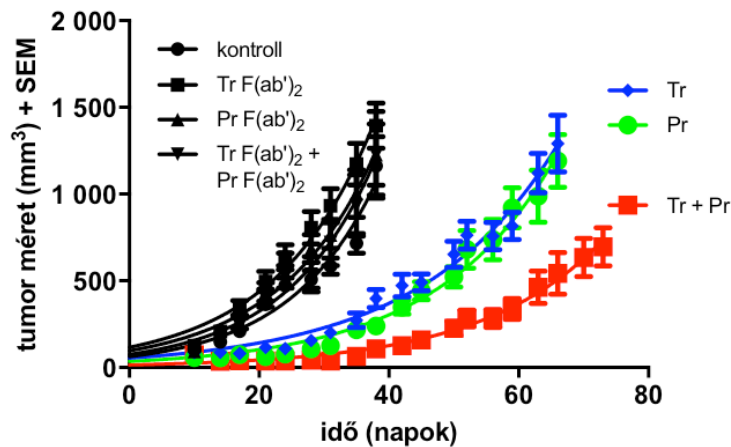
Az in vivo daganatellenes hatás vizsgálata

A vizsgált antitestek és azok F(ab')₂ fragmentumainak *in vivo* hatását SCID egérbe szubkután xenotranszplantált JIMT-1 tumor sejteken vizsgáltuk.

A kezeléseket hatásosságuk alapján három csoportba oszthatjuk (fekete; kék-zöld; piros) (27. ábra). A csoporton belül a kezelések hatékonysága egymáshoz képest statisztikailag nem különböző, de a csoport minden tagja statisztikailag szignifikánsan eltér a többi csoport bármelyik tagjától.

A kontrollhoz HEPES pufferrel kezelthez képest a trastuzumab és pertuzumab antitestek gátolták a xenograftok növekedését, mely megegyezett munkacsoportunk korábbi eredményeivel. A két antitest hatékonysága között különbség nem volt látható. A két antitestet kombinációban alkalmazva – a monoterápiában használt dózisaikban –, a tumor növekedése jelentősen csökkent a monoterápiához képest. Ezzel szemben sem a trastuzumab F(ab')₂, sem a pertuzumab F(ab')₂ fragmentumok, sem ezek kombinációi nem csökkentették az *in vitro* rezisztens JIMT-1 tumorok növekedését a kezeletlen kontrollhoz képest.

Ebből arra következtethetünk, hogy az egész antitestek *in vivo* hatásmechanizmusában az Fc rész játszik jelentős szerepet. Az immunhiányos SCID egerekre jellemző, hogy az NK-sejtjeik érettek és funkciójuk nem gátolt, így az Fc részén keresztül megvalósuló ADCC feltételezhető. Ez a feltételezés összhangban van a JIMT-1 sejtek HER2 ellenes antitestekkel szemben *in vitro* tapasztalt intrinszik – biológiai – rezisztenciájával, és az antitestek ADCC-t kiváltó szerepét hangsúlyozza.



27. ábra. Anti-HER2 antitestek és F(ab')₂ fragmentumaik *in vivo* tumor növekedést gátló hatása.

Az antitestek és F(ab')₂ fragmentumaik *in vivo* tumorelles hatását SCID egerek bőre alá xenotranszplantált JIMT-1 tumorokkal vizsgáltuk.

A kontrollhoz képest sem a trastuzumab F(ab')₂, sem a pertuzumab F(ab')₂, sem kombinációik nem csökkentették a tumor növekedését. A trastuzumab és pertuzumab teljes antitestek monoterápiában alkalmazva szignifikánsan csökkentették a daganat méretét (21. naptól, $p < 0,05$), és a két antitest hatása egymástól statisztikailag nem tér el.

A két teljes antitest kombinációban adva jelentősen lassítja a tumor növekedését a monoterápiás csoportokkal szemben is (trastuzumabhoz és pertuzumabhoz képest rendre a 38. illetve 42. naptól, $p < 0,05$).

Ex vivo szövettani analízis

A kezelések *in vivo* tapasztalt daganatellenes hatásának további vizsgálatához az állatok terminálása után azokat felboncoltuk. A boncolás során a fő életfontosságú szerveket makroszkóposan vizsgáltuk, ezeken kóros elváltozást nem tapasztaltunk. A xenograft daganatokat fagyasztottuk, és mikroszkópos vizsgálatnak vetettük alá.

A xenograft daganatokból készült metszetekben a JIMT-1 sejteket a humán HER2, míg az NK-sejteket a CD45 specifikus immunfluoreszcenciás jelölésével azonosítottuk. Egér NK-sejtnak a CD45 pozitív, HER2 negatív, körülbelül 7-10 μm -es, sejtmaggal bíró képleteket definiáltuk (28. ábra). Az immunfluoreszcenciás jelölést a „Tumor xenograft metszetek és immunfluoreszcens jelölésük” fejezetben foglaltaknak megfelelően végeztük.

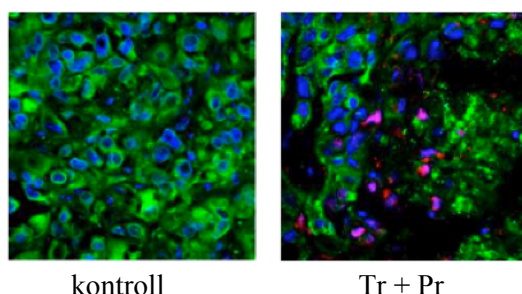
A 14 μm széles metszetek vizsgálatát Zeiss LSM 510 konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal végeztük, a metszet középső 10 μm -es sávját 3 konfokális szeletben vizsgálva, mely lehetővé tette a kisméretű, mérsékelt fluoreszcencia intenzitású NK-sejtek detektálását.

A metszetek vizsgálatakor feltűnt, hogy a xenograft széli részei NK-sejtekben dúsak, míg a metszet – a daganat – középső területein NK-sejteket ritkábban találtunk. Megvizsgáltuk tehát az NK-sejtek számának a penetráció mélységétől való függését, és az egyes kezelések eredményeit összehasonlítottuk (29. ábra). Az NK-sejtek sűrűsége mindegyik kezelés esetén a széli területeken volt a legnagyobb. A tumor perifériás területein az egy látótérre eső NK-sejtszám a kezeléstől nem függ, viszont az egyes daganatoknál – valószínűleg az egerek közötti NK-sejtszám eltérése, a xenograft pontos *in vivo* lokalizációja, érellátása stb. miatt – egymáshoz képest jelentős szórás mutatott. Az összehasonlíthatóság érdekében az egy látótérre eső NK-sejtszámokat az ugyanabban a metszetben a daganat perifériás részein található NK-sejtszámra korrigáltuk. Ez lehetővé teszi, hogy a széli területhez viszonyított NK-sejt denzitás arányát vizsgáljuk a metszet belseje felé haladva, és az egy kezelési csoportba tartozó daganatokból készült metszetek eredményeit átlagolhassuk, a kezelési csoportokat pedig összehasonlítsuk.

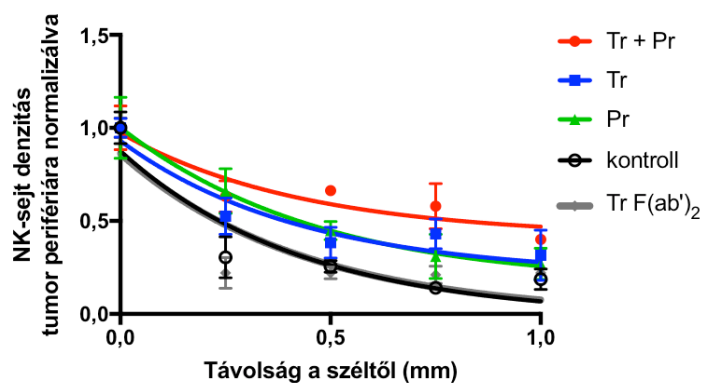
A trastuzumabbal és a pertuzumabbal kezelt tumorokban is nagyobb volt az NK-sejtek sűrűsége a kontrollhoz képest, a trastuzumab és pertuzumab kombinált adása pedig még nagyobb NK-sejt denzitást eredményezett. Megfigyeltük, hogy a kombinált IgG kezeléskor az NK-sejtek mélyebbre tudtak hatolni a tumorba, és abban hosszabb és szélesebb szövethiányokat hoztak létre.

Az NK-sejtek számán kívül arra utaló megfigyelésünk is volt, hogy az IgG és kombinált IgG kezelés során az NK-sejtek nem csak nagyobb számban vannak jelen a daganatban, de

aktívabbak is. Az NK-sejtek morfológiájára fókuszálva megjelenés szerint azokat két csoportba oszthattuk. A HER2-pozitív sejtekkel kapcsolatban álló, feltehetőleg ölü szinapszist képző NK-sejtek laposak, a daganatsejt felszínére lapultak, míg a tumorsejtektől távol lévő NK-sejtek kerek, nem alakítanak ki szinapszist. A lapos/kerek NK-sejt arány a trastuzumab $F(ab')_2$ -vel kezelt daganatban 0,48 volt, míg az IgG monoterápiában (trastuzumab vagy pertuzumab) 1,17. A kombinációs kezelésben ennél is magasabb, 1,68-as arányt kaptunk. Az NK-sejt denzitás arányokon felül a lapos/kerek NK-sejtek aránya is alátámasztja az IgG kezelések ADCC-t kiváltó funkcióját, amennyiben azok az éppen aktív és nem-aktív NK-sejtek arányát jelentik.



28. ábra. JIMT-1 xenograft tumorok *ex vivo* immunfluoreszcenciás jelölése
A JIMT-1 sejteket HER2 antigénjeit
HER2, NK-sejt (CD45), sejtmag. Látótér: 225 x 225 μ m

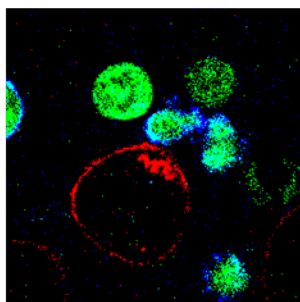


29. ábra. JIMT-1 xenograft tumorok *ex vivo* szövettani analízise az NK-sejtek eloszlásának meghatározásához

Az egy látótérre eső NK-sejtszámokat az ugyanabban a metszetben a daganat széli részén található NK-sejtszámra korrigáltuk és „one site competition” függvénnyel illesztettük.

Az in vitro ADCC vizsgálata

Az effektor NK-sejtvonal funkcionális működésének megjelenítéséhez eGFP-t és nagy affinitású CD16 receptort kifejező CD16.NK-92 sejtek és JIMT-1 sejtek kokultúráját vizsgáltuk *in vitro* konfokális mikroszkóppal, szaturáló koncentrációjú trastuzumab antitest mellett (30. ábra).



30. ábra. Az NK-92 sejtek által *in vitro* létrehozott „ölő”-szinapszis vizsgálata konfokális mikroszkóppal

piros: HER2; zöld: eGFP-t kifejező NK-92 sejtek; kék: CD16. Látótér: 60 μ m x 60 μ m.

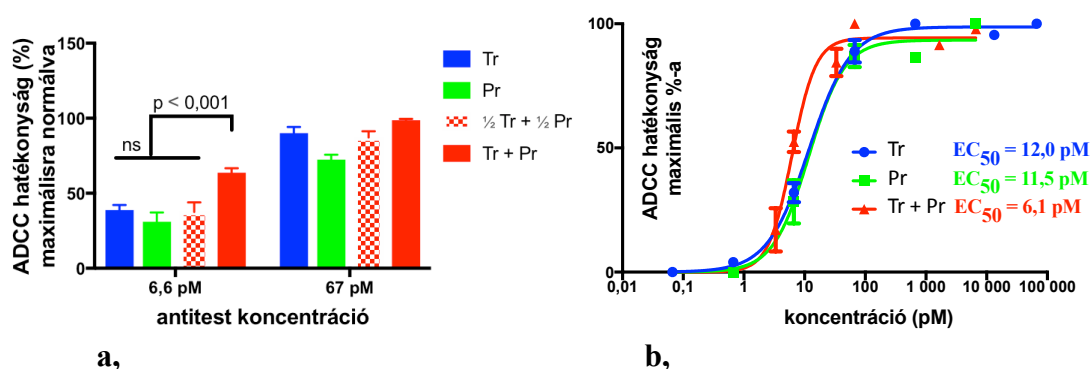
Az *in vivo* észlelt kombinációs hatás kvantitatív kiértékeléséhez az ADCC *in vitro* vizsgálatát végeztük el az *in vivo* kísérletben is használt JIMT-1, valamint nagy affinitású CD16 receptort kifejező NK-92 sejtvonallal.

Az impedancia alapú sejtanalizátorral végzett ADCC módszerrel először meghatároztuk azt az antitest koncentráció tartományt, amiben ADCC már kialakul, de még dóziszfüggést mutat. A 31. ábrán látható, hogy 6,6 pM antitest koncentráció már detektálható sejtlést mediált NK-sejtek jelenlétében. A 67 pM koncentráció trastuzumab esetén már 90% körüli hatékonyságú sejtlést váltott ki (31. b. ábra), míg az ennél nagyobb koncentrációk maximális ölést váltottak ki (31. b. ábra). Az antitestek magukban, NK-sejtek hozzáadása nélkül, nem okozták a target sejtek pusztulását.

Annak érdekében, hogy vizsgálhassuk a kombinációs kezelések hatékonyságát a monoterápiához képest, a monoterápiás kezelések koncentrációját 6,6 illetve 67 pM-ra állítottuk be, a kombinációs kezeléseknél pedig az egyes antitestek koncentrációja ennek megfelelő (6,6 és 67 pM) illetve ennek fele volt (3,3 illetve 33 pM). Az F(ab')₂ antitestek kombinációját és részletes dóziszfüggését nem vizsgáltuk, mivel azok önmagukban nem eredményeztek ADCC-t (15. és 27. ábrák).

Az eredmények azt mutatták, hogy mind a trastuzumab IgG, mind a pertuzumab IgG dózisfüggő módon eredményezett ADCC-t, és ezáltal csökkentette a sejtindeket. A pertuzumab némileg kevésbé volt hatékony a trastuzumabhoz képest. A kombinációs kezeléseknél abban az esetben, amikor a két antitest koncentrációjának összege (3,3 pM + 3,3 pM vagy 33 pM + 33 pM) megegyezett az önállóan alkalmazott antitest koncentrációjával (6,6 pM vagy 67 pM), a citotoxicitás megegyezett. A kombinációban, amennyiben az összes koncentráció az egyedi kétszerese volt, nem szaturáló koncentrációnál (6,6 pM + 6,6 pM) a kétszeres koncentrációjú önálló kezelésnek megfelelő átlagos hatékonyságot adta. Az EC_{50} értékeket Hill-egyenlettel meghatározva a kombinált kezelés EC_{50} értéke 6,1 pM, szemben az önálló kezelés 12,0 pM (trastuzumab) és 11,5 pM (pertuzumab) értékeivel, ami az additivitást támasztja alá.

Szaturáló koncentrációnál (67 pM + 67 pM) a kombináció nem okozott szignifikáns hatás növekedés.



31. ábra. A trastuzumab, a pertuzumab és kombinációjuk által kiváltott *in vitro* ADCC kvantitatív jellemzése

A JIMT-1 sejteken HER2 ellenes antitestek által kiváltott ADCC hatékonyságának populációsintű (90.000 JIMT-1 sejt/lyuk) vizsgálata NK-92 effektor sejtekkel, ECIS Z θ impedancia alapú sejtanalizátorral történt. Az effektor / target sejtarány minden esetben 2,5:1 volt.

a, A kontrollra normalizált sejtindeket görbék végpontjaiból, ≥ 3 független kísérlet és kísérletenként ≥ 2 replikátum eredményeinek összegzése után, a legnagyobb (telített) ölhatalásra normált ADCC hatékonyság.

b, A trastuzumab, pertuzumab és kombinációik által kiváltott ADCC hatékonyság függése a koncentrációtól. A koncentrációk logaritmikus skálán, a mérési adatokra Hill egyenletet illesztettünk, mely meghatározta az EC_{50} értékeket.

A hibajelek a SEM értékeket mutatják.

Következtetések

A kísérleti modellrendszerünk miatt felmerült az igény az immunrendszert leképező és kvantitálható *in vitro* kísérleti módszerekre, a radioaktivitás mellőzésével. Kísérleti módszerfejlesztésünk célja a letapadó célsejtek számára ideális nem-radioaktív *in vitro* kísérleti módszer megtalálása és validálása volt. Ehhez számos módszert hasonlítottunk össze, de kihagytunk technikailag nagyon bonyolult „kit”-eket, melyek módosított sejteket igényelnek (TAG-Lite Assay [Cisbio], ADCC Reporter Bioassay [Promega]).

Mivel az ADCC két sejttípus interakcióját jelenti, a jó *in vitro* módszer felé az első és egyik legfontosabb elvárás a sejttípusok elkülönítése. A felszabadulós (release) vizsgálatokban – akár radioaktív, akár nem – az elkülönítés a célsejtek megjelölésével, „jelölőanyaggal feltöltésével” történik a kísérlet elején. A jelölőanyaggal való feltöltés önmagában is befolyásolhatja a célsejteket (pl. életképesség csökkenése), de a jelölőanyag spontán felszabadulása is csökkenti a módszerek szenzitivitását és a kísérlet reprodukálhatóságát. Ezt tapasztaltuk mind a FDA, mind a CFSE jelölés esetében. Ezen túlmenően a célsejt populáción belül a változó ABC-transzporter expresszió és aktivitás a célsejtek jelölődésében is heterogenitást okozhat.

Más, gyakran használt felszabadulós vizsgálatokról, például a disszociáció-erősített lantanida fluoro-immuno teszt (DELFI) típusú módszerektől sem várhatunk mást, mint a FDA felszabadulás módszertől a túl korai, nem kontrollálható felszabadulás tekintetében, még akkor sem, ha nagyobb szenzitivitást ígérnek. A hasonló elven alapuló endogén GAPDH felszabaduláson alapuló módszerhez számos „kit” elérhető, de kimutatták, hogy a GAPDH teszt az életképességben bekövetkező változásokat csak szűk tartományban tudja vizsgálni, és ott sem feltétlenül lineáris (11). Emellett, mivel endogén markerről van szó, az ölsejtekből felszabaduló GAPDH szintén nagymértékben befolyásolhatja az eredményt. Nem csak a GAPDH felszabadulás mérésére, hanem valamennyi felszabaduláson alapuló tesztre igaz, hogy a célsejtek aktuális metabolikus állapota, az azokat ért korábbi hatások jelentősen módosíthatják az eredményt, növelhetik a független mérések közötti különbségeket.

A gyakran sejthalál indikátorként használt propidium-jodid se nem szenzitív, se nem specifikus az ADCC kiváltotta sejthalálra. A PanToxiLux a hasonló kaszpáz aktivitást mérő tesztekkel együtt már az ADCC kezdeti intracelluláris lépéseit érzékeli, szenzitivitása és specificitása jobb.

De ezen módszereknél is fennáll, hogy szuszpenzióban kell tartanunk a sejteket, ami a letapadó célsejtek számára nem fiziológias állapot, befolyásolhatja az életképességet, szenzitivitást, és ami a célzott terápia számára talán legfontosabb, a sejtfelszíni molekulák megjelenését, megcélozhatóságát. A célsejtek pusztulása után azok fragmentálódása, valamint a szuszpenzióban tartás miatt bekövetkező spontán sejthalál is befolyásolhatja a kísérlet eredményét.

A megvizsgált módszerek közül az ECIS Z θ impedancia alapú valós idejű sejtanalizátorral végzett ADCC vizsgálat rendelkezett a legnagyobb szenzitivitással és volt a leginkább kvantitálható.

Az impedancia mérésén alapuló, jelölésmentes technológiák lehetővé teszik a kísérleti rendszer folyamatos követését, megengedve többek között a kitapadás, szétterülés, proliferáció és sejthalál vizsgálatát. Ezen módszerek azt is lehetővé teszik, hogy csak a letapadó célsejtről nyerjünk információt, a szuszpenzióban maradó NK-sejteket kizárjuk a mérésből. A mérés nem befolyásolja a rendszert, így lehetővé válik az ADCC folyamatos, valós idejű monitorozása. Letapadó célsejtek esetén az *in vitro* ADCC pontos kvantitatív vizsgálatához tehát az impedancia alapú sejtanalizátort javasoljuk az alábbi okok miatt:

- A letapadva növekvő célsejtek másképp viselkedhetnek szuszpenzióban tartva. A célzott molekulák mobilisabbá válhatnak, vagy a klinikailag fontos, antigént elrejtő mechanizmusok eltűnhetnek (76).
- Az impedancia mérés kevésbé van hatással a célsejtekre, mint a szubsztráttal való feltöltés.
- Az effektor sejtek nem tapadnak le, így nem befolyásolják az impedancia mérést.
- A módszer a végleges, sejtpusztulást előidéző hatásokat méri a célsejteken, mert csak a ténylegesen felvált vagy megváltozott morfológiájú sejtek okoznak csökkenést a mért ellenállásban.
- Mivel minden időpontban a még életképes és szokványos morfológiájú sejtek mennyiségével arányos paramétert mérünk, az elpusztult célsejtek fragmentálódása és mérhetetlenné válása nem zavarja a kísérletet.
- Az ADCC időbelisége vizsgálható és jól kvantitálható, az ADCC kismértékű változása (koncentrációfüggése, a különböző antitestek hatékonysága) is detektálható, így a kezelőágensek, terápiás módok összehasonlító elemzésére is alkalmas.

Az összes *in vitro* ADCC mérési módszerre igaz, hogy az NK-sejtek antitest nélküli alapaktivitását nem lehet figyelmen kívül hagyni, és minden kísérletben kontrollként az

antitest nélkül adott NK-sejteket kell kontrollként alkalmazni, a többi mérést azok hatékonyságára kell korrigálni/normalizálni. Tapasztalatunk szerint ez az alap-aktivitás perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek esetén rendkívül változékonny lehet, így megfelelő sejtvonal alkalmazása tovább pontosíthatja a mérést.

Az impedancia alapú módszer szuszpenzióban nöövő célsejtek esetén is alkalmazható, de a célsejtek felülethez való rögzítését igényli. Emiatt szuszpenzióban nöövő célsejtek esetén a PanToxiLux teszt és rokon módszerek hatékonyabbak lehetnek az ADCC radioaktivitásmentes *in vitro* mérésére, hiszen kevésbé módosítják a célsejtek membrán- és citoskeletális struktúráját.

További munkánk során így az ADCC vizsgálatára az impedancia mérésen alapuló módszert alkalmaztuk, és a nagy affinitású CD16 receptort kifejező CD16.NK-92 sejtvonalat használtuk effektorként.

A kísérleteink fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk, a trastuzumab és pertuzumab kombinációja előnyt jelent-e a HER2 pozitív daganatok kezelésében, szem előtt tartva a trastuzumab rezisztens daganatokat is, ami az emlőrákos esetek akár több mint 50%-át is jelentheti (51,57). A kombináció hatékonyságát annak hatásmechanizmusának tisztázásával kívántuk egyértelműsíteni. Az antitestek direkt biológiai (jelátviteli) és ADCC-t kiváltó hatásai között az elkülönítés a trastuzumab és pertuzumab teljes antitestek, valamint F(ab')₂ fragmentumaik összehasonlító vizsgálatával vált lehetségessé.

Az Fc rész eltávolításához pepszin-agarózos emésztést optimalizáltunk. Igazoltuk, hogy az F(ab')₂ fragmentek

- az Fc specifikus immunfluoreszcenciás jelöléssel nem jelölhetők,
- a HER2-höz a teljes antitestekhez hasonló erősséggel kötődnek,
- *in vitro* proliferációt gátló hatása az egész antitestéhez hasonló, vagy nagyobb mértékű a BT-474 sejteken
- az ismert rezisztens JIMT-1 sejtvonal *in vitro* proliferációját nem gátolják
- ADCC-t nem váltanak ki sem *in vitro*, sem *in vivo*.

A modellrendszereink lehetővé tették, hogy a két antitest kombinációjának direkt biológiai hatását kvantitálhassuk a külön-külön adott antitestekre *in vitro* önmagában érzékeny BT-474 sejteken. Az izoból görbék azt mutatták, hogy az antitestek kombinációja additív hatást fejtett ki az IgG és F(ab')₂ fragmentumok esetén is. A két antitesttel elérhető maximális hatás nagyobb volt, mint bármelyik antitestet egyedül alkalmazva. Ez azt támasztja alá, hogy a két antitest eltérő hatásmechanizmussal befolyásolja a HER2 jelátvitelt: trastuzumab esetén a HER2 leszabályozással (77), pertuzumab esetén a dimerizáció gátlással (63), melyek egymástól függetlenül képesek a sejtnövekedést gátolni.

Bár semelyik antitest, F(ab')₂ fragmentum, vagy kombináció sem tudott *in vitro* közvetlen biológiai hatást kiváltani a JIMT-1 sejteken, a teljes antitestek képesek voltak ADCC-t mediálni *in vitro* és *in vivo* is.

Az *in vitro* eredményeknek megfelelően a JIMT-1 xenograftok *in vivo* növekedését az F(ab')₂ fragmentumok nem csökkentették, nem tudtak ADCC-t kiváltani. A trastuzumab és a pertuzumab egyenértékű daganatellenes hatást mutattak. A trastuzumab által kiváltott hatás a korábbi kísérleti eredményeinkkel összhangban van (56). A felhasznált SCID egerekben makrofágok és neutrofil granulociták funkciója és száma a gyártó (Fox Chase) leírása alapján normális. Közülük az antitesten keresztüli effektor folyamatokban az elsődleges, NK-sejtes hatáson túl a makrofágok szerepe merült fel hangsúlyosabban az antitestfüggő sejtes fagocitózis (ADCP) folyamata miatt. Mivel a terápiában használt IgG antitestek affinitása a makrofágok Fcγ receptoraihoz jelentősen kisebb, mint az NK-sejtek FcγRIII receptoraihoz (78), az alkalmazott antitestek klinikai hatása, és egyben a modellrendszerünkben kifejtett hatása is végsősoron az ADCC-ben manifesztálódik, a többi CD16 alapú hatás kisebb affinitású receptorokon keresztül zajlik, és járulékosnak, háttér jellegűnek, vagy ambivalensnek tekinthető.

Az *in vivo* eredmények alapján az ADCC a terápiás antitesteknek egy értékes hatásmechanizmusa, mellyel *in vitro* trastuzumab-rezisztens, HER2-pozitív daganatoknál is számolhatunk. Az antitestek kombinációs alkalmazása jelentősen hatékonyabb lehet. Megmutattuk, hogy a kombinációs kezelés növeli a daganatot infiltráló, valamint a daganatsejteket aktívan megtámadó NK-sejtek számát, és ez fordított korrelációban van a tumor progressziójával és méretével.

A kombináció ADCC-t fokozó hatásának vizsgálatához az ADCC antitest koncentrációfüggésének vizsgálatát is elvégeztük *in vitro*. Ugyanazon JIMT-1 sejteket használva azt tapasztaltuk, hogy a két antitest az ADCC-t nem-szaturáló koncentrációinál

additívan viselkedett, de szaturáló koncentrációknál, amikor a maximális ADCC-t már külön-külön is elérték, nem tudott még hatékonyabb ADCC-t létrehozni. Ez magyarázható azzal, hogy az ADCC-t kiváltó hatás *de facto* mindkét antitest esetén ugyanúgy, az Fc részen és az NK-sejtek Fc γ receptorain keresztül történik, és a mechanizmus telítődik, amikor elegendő Fc γ receptor gyűlik az immunológiai ölé szinapszisba.

Mivel az *in vivo* kezeléseknél is legalább additivitást észleltünk, így valószínű, hogy az *in vivo* alkalmazott dózisok nem voltak telítők. Ennek egyik legvalószínűbb oka, hogy az 5 mg/kg antitest dózis a tumorban nem ér el szaturáló koncentrációt (79). Bár nehéz megbecsülni a pontos szöveti antitest szinteket (79,80), a dózisok a klinikai terápiához hasonlóak, sőt, az egerek oltását gyakrabban (hetente kétszer) végeztük, míg a kezelés a klinikumban kéthetente vagy ritkábban történik, emiatt a klinikumban az egérben elért szövetszinteknél is alacsonyabb lehet az antitest koncentráció.

További befolyásoló faktorok, amiket figyelembe kell venni az *in vivo* alacsonyabb NK-sejt: célsejt arány, az *in vivo* természetes NK-sejtek alacsonyabb Fc γ RIII receptora az *in vitro* rendszerünkben használt nagy affinitású CD16.NK-92 sejtek receptorához képest. Ezek közösen mind hozzájárulhatnak a csökkent ADCC szaturációhoz *in vivo*, és hogy a két terápiás antitest dózis kombinációban *in vivo* additíven hat.

A JIMT-1 sejtek *in vivo* trastuzumab és pertuzumab érzékenységevel kapcsolatban fontos megemlíteni munkacsoportunk korábbi kísérleteit, miszerint a JIMT-1 sejtek trastuzumab rezisztenciája *in vivo* is ténylegesen kialakul. A JIMT-1 sejtek intrinszik rezisztencia mechanizmusai közé tartozik a magas mukoszialoprotein (MUC4), CD44 és hialuronsav expresszió (55,59,81), mely nehezen penetrálható extracelluláris mátrixot eredményez, megakadályozva a terápiás antitest kötődését, és ily módon lehetetlenné téve annak közvetlen biológiai hatásait. Ez, amellet, hogy részben magyarázza a JIMT-1 sejtek *in vitro* trastuzumab rezisztenciáját, *in vivo* is ellenállóképességet kölcsönöz a növekvő daganatnak. A trastuzumab kötődés gátlása önmagában is megfiúsítja az ADCC mechanizmusát, de az is felvethető, hogy az NK-sejtek nem képesek felismerni az esetleg mégis bekötődött antitest Fc részét, így nem aktiválódik az ölési mechanizmus.

Kísérleteinkben azt használtuk ki, hogy a frissen feltripszinezett JIMT-1 sejtek s.c. injekciójakor a kifejlett extracelluláris mátrix még nincs jelen, de az antitest kezelést már elindítottuk. Ezáltal jelentős mértékű ADCC-t tudtunk kiváltani, mely csökkentette a daganatok növekedését. A tumorok növekedésével párhuzamosan azonban a fejlett ECM és általa a szterikus gátló hatás fokozatosan kialakul, s így kb. 250 μm^3 -es daganattér fogat

elérése után az antitesttel monoterápiában vagy akár kombinációban kezelt daganatok is ugyanolyan ütemben nőnek, mint a kezeletlen daganatok. A daganatellenes hatás tehát a rezisztens JIMT-1 daganatok esetén a kis térfogatú/nagyságú daganatoknál jelentősebb. Ez a valós körülmények között a vérben keringő és távoli területeken megtapadó disszeminált daganatsejtek (mikrometasztázisok) esetén fontos, mert az eredmények alapján (55) a HER2 ellenes antitestek ezen keringő és disszeminált tumorsejtekhez ECM híján könnyen kötődnek, és azok pusztulását okozzák ADCC-n keresztül. Mindez pedig akkor is igaz, ha a primer daganat (már) antitest terápiára rezisztensnek mutatkozik, és a jelenlegi protokollok alapján a kezelés nem folytatandó. Tekintve, hogy a trastuzumab-pertuzumab kombináció additívan hatékonyabbá teszi az ADCC-t, alkalmazása nem csak a tumor növekedési ütemét csökkenti, késleltetve ezzel az antitest-rezisztencia kialakulását, hanem ezt követően is hatékonyabban gátolja a tumorsejt disszeminációt, mint a monoterápiák bármelyike önállóan.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a HER2-ellenes antitestek által kiváltott ADCC hatékonyan veszi fel a HER2 pozitív daganatokkal a harcot, még trastuzumab rezisztencia esetén is, ami az esetek akár 50%-át is jelentheti (51,57). Mivel a maximális tolerálható/klinikailag engedélyezett dózisoknál mind a direkt biológiai hatások, mind az ADCC esetén additivitást észlelünk az antitestek között, a trastuzumab és a pertuzumab együttes alkalmazása a legjobb választás minden HER2-pozitív daganatban. Különösen igaz lehet ez, ha rezisztencia kialakulását észleljük, mert a két antitest együttes adásával elért magasabb antitest koncentráció, valamint az eltérő antitest kötőhely miatt a beteg saját NK-sejtjeinek hatékonyságát növelhetjük. Ha a daganat trastuzumabra érzékeny, akkor az eltérő molekuláris hatásmechanizmus miatt a két antitest közvetlen biológiai hatékonyságának additivitása hozzáadódik a megnövekedett ADCC hatáshoz is. A két additív hatás alátámasztja a klinikai biomarker analízisre fókuszáló CLEOPATRA tanulmányt, ami feltárta, hogy a HER2 az egyedüli marker, ami a betegek kiválasztásához szükséges, és hogy csak a HER2, HER3 és PIK3CA volt releváns prognosztikai faktor (82).

Ha az additivitást tágabban értelmezzük, felmerül, hogy érdemes lehet további molekulárisan célzott terápiás ágensekkel bővíteni a HER2-pozitív tumorok kezelési spektrumát. Ezek közül a lapatinibet, egy kettős (HER2 és EGFR) tirozin kináz inhibitor, sikeresen alkalmazták kemoterápiával kombinációban, és alkalmazását a FDA is engedélyezte (83). Az EPHOS-B randomizált tanulmányban a lapatinib és a trastuzumab együtt jelentősen csökkentette a HER2-pozitív daganatok növekedését már 11 nappal a diagnózis után, ami a trastuzumab monoterápiához képest előnyt jelentett: patológiailag teljes válasz 11%-ban volt

megfigyelhető a 0%-kal szemben, és minimális reziduális betegség a betegek 17%-ban volt a 3%-kal szemben (84). A kombináció előnye valószínűleg abból fakad, hogy alternatív úton, a mechanikai hozzáférhetőségtől függetlenül gátolják a HER2 és EGFR fehérjék kináz aktivitását, még azon sejtekben is, amelyekhez a trastuzumab nem tud jól kötődni, vagy a HER2 leszabályozása nem sikeres. Ez a kiegészítő hatás fordítva is működik, a trastuzumab hozzáadása a lapatinib monoterápiához növelte a teljes túlélés mediánját 4,5 hónappal (85). Ennek fényében a lapatinib, trastuzumab és pertuzumab tripla kombináció még hatékonyabb lehet, mint a trastuzumab és pertuzumab kombinációja, bár a kinázgátlás, legfőképp az EGFR, hosszútávú tolerálhatósága probléma lehet (86).

A HER2-pozitív daganatok esetén az antitestek kombinációs adása már a kezdetektől összességében biztonságosnak és jótékony hatásúnak tűnik, melyet jelenleg a 3. fázisú APHINITY klinikai tanulmány vizsgál. A jelenlegi preklinikai és klinikai adatok alapján egy folyamatban lévő trastuzumab monoterápiáról javasolt a váltás a kombinációs kezelésre. Van rá példa, hogy a trastuzumab és pertuzumab kombinációja jótékony volt a korábban trastuzumab mellett progrediáló daganat esetén is (87). A CLEOPATRA tanulmányból az a következtetés is felmerült, hogy a trastuzumab és pertuzumab terápiát metasztatikus emlőrák esetén nem is szabad abbahagyni (88), ami a keringő és disszeminált daganatsejtek korábban említett szenzitivitása miatt érthető és logikus következtetés. A kombinált kezelés ADCC mediálásában észlelt additív hatása, valamint a tumor disszemináció megakadályozásának fontossága miatt a HER2-pozitív emlődaganatok adjuváns kezelésére a kombinált antitest terápiát javasoljuk elsővonalbeli kezelésként, és a terápia abbahagyását, szüneteltetését nem javasoljuk.

A klinikai terápiában adható maximális koncentrációkat klinikai tanulmányok határozzák meg, melyeket *in vivo*, az állatkísérleteinkben is alkalmaztunk. Ezen dózisok mellett a két antitest együttes alkalmazása jelentősen késleltette a daganat növekedését. A kísérleteinkkel párhuzamosan – és függetlenül zajló – klinikai kipróbálások eredményein alapulva a pertuzumabot 2013-ban engedélyezte a FDA HER2-pozitív metasztatikus emlődaganatok terápiájában trastuzumabbal és docetaxellel kombinálva azon betegeknél, akik korábban nem kaptak HER2-ellenes terápiát vagy kemoterápiát a betegségükre.

Kísérleteink alapján felvetjük, hogy a legjobb hatás elérése érdekében a trastuzumab mellett a pertuzumab adása általánosan javasolt mindenféle preszelekciós kritérium nélkül, a maximális engedélyezett koncentrációban.

Összefoglalás

A HER2-ellenes célzott antitest kezelések témakörében a klinikumban alkalmazott trastuzumab és pertuzumab kombinációjának előnyét vizsgáltuk HER2-pozitív daganatokban, szem előtt tartva a trastuzumab rezisztencia jelenségét, mely HER2-pozitív emlőrákok esetén 50%-nál is gyakoribb. A kombináció hatékonyságát hatásmechanizmusának vizsgálatával támasztottuk alá. Az antitestek közvetlen biológiai (jelátviteli) és az ADCC-t kiváltó hatásai között az elkülönítést a trastuzumab és pertuzumab egész antitestek, valamint F(ab')₂ fragmentumaik összehasonlító vizsgálatával végeztük.

Az *in vitro* ADCC vizsgálatokhoz nem-radioaktív kísérleti módszert kerestünk. Vizsgáltuk a FDA és a CFSE felszabadulás mérésén, a CFSE és propidium jodid jelölésén, valamint a kaszpáz aktiváció kimutatásán alapuló áramlási citometriás módszereket, valamint az impedancia alapú sejtanalizátor alkalmazhatóságát. A legnagyobb dinamikus tartományt és az antitest dózis-hatásfüggvényének kvantitálását ez utóbbi biztosította, így letapadó célsejtek esetén az impedancia alapú sejtanalizátor módszert, szuszpenzióban nöövő célsejtek esetén a kaszpáz aktiválódás áramlási citometriás meghatározását javasoljuk az ADCC radioaktivitás-mentes *in vitro* mérésére.

A teljes trastuzumab és pertuzumab antitestekből kiindulva pepszin-agarózos emésztéssel az F(ab')₂ rész sérülése nélkül távolítottuk el az Fc fragmentumot.

In vitro a teljes és F(ab')₂ antitest kezelések a JIMT-1 sejtek növekedését nem csökkentették, az ismertén trastuzumab-érzékeny BT-474 sejtvonalnál a két antitest kombinációja az egyedi kezeléseknél nagyobb, de additív proliferációgátló hatást eredményezett teljes antitestek és F(ab')₂ fragmentumok esetén is.

In vivo az F(ab')₂ fragmentumok nem, a teljes antitestek egymáshoz hasonló mértékben csökkentették a JIMT-1 xenograft növekedését. A teljes antitestek kombinációja fokozottan gátolta a tumor növekedést, mely korrelált a xenograftok *ex vivo* immunfluoreszcenciás jelölésével kimutatható fokozott NK-sejt penetrációval. *In vitro* ADCC kísérletekben a két antitest kombinációja nem-szaturáló koncentrációknál additív volt.

Ezek alapján feltehető, hogy a jelenleg klinikumban engedélyezett maximális antitest dózisok *in vivo* nem telítik az ADCC-t. Emiatt a daganat felfedezése után mihamarabb célszerű mindkét antitestet a klinikai kipróbálások során meghatározott maximális tolerálható dózisában, kombinálva alkalmazni. Mivel a keringő tumorsejtek kifejezetten érzékenyek az ADCC-re, a kombinált antitest terápiát még a primer daganat rezisztenciája esetén is célszerű folytatni a metasztázisok kialakulásának gátlására.

Summary

Focusing on anti-HER2 targeted antibody treatments, we examined the combination of trastuzumab and pertuzumab antibodies in the treatment of HER2-positive breast cancer. The phenomenon of trastuzumab resistance is of great importance due to its high, over 50% rate. In this work, we have demonstrated the superior efficacy of combination therapy and investigated its mechanism of action. To separately analyze antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) -based and direct biological effects of the antibodies, we performed comparative studies of the whole antibodies and its F(ab')₂ fragments.

First, we aimed to find the most suitable nonradioactive method for quantitating *in vitro* ADCC against adherent cells. We compared FDA and CFSE release, propidium iodide uptake of the CFSE labeled cells, assays based on the detection of caspase activation in flow cytometry; and an impedance-based real-time cell adhesion test.

The largest dynamic range and the quantitation of antibody dose-response were possible with the latter, and therefore used we recommend this technique as the best non-radioactive choice for ADCC of adherent target cells, However, we recommend flow cytometric detection of caspase activation in target cells that are in suspension.

Next, we have produced intact functional F(ab')₂ fragments from both trastuzumab and pertuzumab by removing the Fc fragment using pepsin-agarose digestion. We have used these and the whole antibodies for *in vitro* and *in vivo* investigations. Neither the whole nor the F(ab')₂ antibodies decreased the proliferation of the *in vitro* trastuzumab-resistant JIMT-1 cells. The combination of both the whole or the F(ab')₂ antibodies showed an additive antiproliferative effect on the trastuzumab-sensitive BT-474 cells.

The F(ab')₂ fragments did not decrease the growth of JIMT-1 xenografts *in vivo*, but the whole antibodies were equally efficient. Combination of the whole antibodies decreased the proliferation further, which effect correlated with the decreased penetration of NK cells into the tumor, showed by *ex vivo* immunofluorescent labeling. *In vitro*, the combination of the two antibodies showed additivity in ADCC, but only at non-saturating concentrations.

Overall, we propose that the therapeutic antibody doses currently approved do not saturate ADCC *in vivo*. Thus it is advisable to use both antibodies at the maximal approved doses in combination as soon as possible after the diagnosis. As circulating tumor cells are pronouncedly sensitive to ADCC, combination therapy should be continued as metastasis prevention even when the primary tumor is resistant.

Irodalomjegyzék

Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Prendergast GC, Jaffee EM. Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2013. 655 p.
2. Frank S. Immunology and Evolution of Infectious Disease. Volume Chapter 4, Specificity and Cross-Reactivity: Princeton University Press; 2002.
3. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. Nature Reviews Immunology 2001;1:41.
4. Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. Experimental Hematology;29:1157-1168.
5. Erdei A, Sármay G, Prechl J. Immunológia: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2012.
6. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cellular And Molecular Immunology 2013;10:230.
7. Orange JS. Natural killer cell deficiency. The Journal of allergy and clinical immunology 2013;132:515-526.
8. Yamashita M, Kitano S, Aikawa H, Kuchiba A, Hayashi M, Yamamoto N, Tamura K, Hamada A. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flowcytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. Scientific Reports 2016;6:19772.
9. Flieger D, Gruber R, Schlimok G, Reiter C, Pantel K, Riethmuller G. A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. J Immunol Methods 1995;180:1-13.
10. BioTek. Automated Non-Radioactive Assay Methods For ADCC and CDC Assays. BioTek; 2013.
11. Cho MH, Niles A, Huang R, Inglese J, Austin CP, Riss T, Xia M. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. Toxicol In Vitro 2008;22:1099-106.
12. Bagnaninchi PO, Drummond N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:6462-7.
13. Mitra P, Keese CR, Giaever I. Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. Biotechniques 1991;11:504-10.

14. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1554-1559.
15. Opp D, Wafula B, Lim J, Huang E, Lo JC, Lo CM. Use of electric cell-substrate impedance sensing to assess in vitro cytotoxicity. *Biosens Bioelectron* 2009;24:2625-9.
16. Tarantola M, Schneider D, Sunnick E, Adam H, Pierrat S, Rosman C, Breus V, Sonnichsen C, Basche T, Wegener J and others. Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility. *ACS Nano* 2009;3:213-22.
17. Kute T, Stehle Jr JR, Ornelles D, Walker N, Delbono O, Vaughn JP. Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology* 2012;1:810-821.
18. Graf T, Ade N, Beug H. Temperature-sensitive mutant of avian erythroblastosis virus suggests a block of differentiation as mechanism of leukaemogenesis. *Nature* 1978;275:496-501.
19. Sierke SL, Cheng K, Kim HH, Koland JG. Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein. *Biochem J* 1997;322 (Pt 3):757-63.
20. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* 2003;31-53.
21. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-3167.
22. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007;26:6469-87.
23. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276-87.
24. Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002;297:1330-3.

25. Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 2003;11:507-17.
26. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW and others. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;11:495-505.
27. Badache A, Hynes NE. A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners. *Cancer Cell* 2004;5:299-301.
28. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003;421:756-760.
29. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 1997;16:1647-55.
30. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.
31. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
32. Johnson GL, Vaillancourt RR. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:230-8.
33. Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995;5:747-57.
34. Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:256-61.
35. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 2011;23:1515-27.
36. Jeong SJ, Dasgupta A, Jung KJ, Um JH, Burke A, Park HU, Brady JN. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1 transformed cells. *Virology* 2008;370:264-72.
37. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S15-9.
38. Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 2003;22:6570-8.

39. Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182(2):150-62.
40. Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM. ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:5400-7.
41. Paik S, Liu ET. HER2 as a predictor of therapeutic response in breast cancer. *Breast Dis* 2000;11:91-102.
42. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004;5:63-9.
43. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 1998;16:413-28.
44. Turpin E, Bie`che I, Bertheau P, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, Olivi M, Espié M, Marty M, Lidereau R and others. Increased incidence of ErbB2 overexpression and TP53 mutation in inflammatory breast cancer. *Oncogene* 2002;7593-7597.
45. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E and others. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005;16:273-8.
46. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-72.
47. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-30.
48. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
49. Gilcrease MZ, Woodward WA, Nicolas MM, Corley LJ, Fuller GN, Esteva FJ, Tucker SL, Buchholz TA. Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:759-67.

50. Friedlander E, Barok M, Szollosi J, Vereb G. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol Lett* 2008;116:126-40.
51. Monoclonal antibody approved for metastatic breast cancer. *Oncology* (Williston Park) 1998;12:1727.
52. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M and others. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2011;365:1273-1283.
53. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M and others. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 2001;344:783-792.
54. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 1999;26:60-70.
55. Barok M, Balázs M, Nagy P, Rákossy Z, Treszl A, Tóth E, Juhász I, Park JW, Isola J, Vereb G and others. Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer Lett* 2008;260:198-208.
56. Barok M, Isola J, Pályi-Krek Z, Nagy P, Juhász I, Vereb G, sr., Kauraniemi P, Kapanen A, Tanner M, Vereb G and others. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2065-72.
57. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, Cristofanilli M, Arun B, Esmali B, Fritsche HA and others. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:1800-8.
58. Luque-Cabal M, García-Tejido P, Fernández-Pérez Y, Sánchez-Lorenzo L, Palacio-Vázquez I. Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clin Med Insights Oncol* 2016;10:21-30.
59. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005;65:473-82.

60. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1852-7.
61. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 2002;62:4132-41.
62. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 2002;62:5813-7.
63. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004;5:317-28.
64. Genentech. Data From Omnitarg Clinical Program Presented at American Society of Clinical Oncology Meeting. 2005.
65. Hurwitz E, Stancovski I, Sela M, Yarden Y. Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake. *PNAS* 1995;92:3353-7.
66. Klapper L, Vaisman N, Hurwitz E, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y, Sela M. A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 1997;14:2099-109.
67. Friedman LM, Rinon A, Schechter B, Lyass L, Lavi S, Bacus S, Sela M, Yarden Y. Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: Implications for cancer immunotherapy. *PNAS* 2005;102:1915-20.
68. Amiri-Kordestani L, Wedam S, Zhang L, Tang S, Tilley A, Ibrahim A, Justice R, Pazdur R, Cortazar P. First FDA approval of neoadjuvant therapy for breast cancer: pertuzumab for the treatment of patients with HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:5359-64.
69. Boix-Perales H, Borregaard J, Jensen KB, Ersboll J, Galluzzo S, Giuliani R, Ciceroni C, Melchiorri D, Salmonson T, Bergh J and others. The European Medicines Agency Review of Pertuzumab for the treatment of adult patients with HER2-positive metastatic or locally recurrent unresectable breast cancer: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. *Oncologist* 2014;19:766-73.

70. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1585-92.
71. Anikeeva N, Steblyanko M, Fayngerts S, Kopylova N, Marshall DJ, Powers GD, Sato T, Campbell KS, Sykulev Y. Integrin receptors on tumor cells facilitate NK cell-mediated antibody-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2014;44:2331-9.
72. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol* 2008;180:6392-401.
73. Vereb G, Matko J, Szollosi J. Cytometry of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Cell Biol* 2004;75:105-52.
74. Roszik J, Lisboa D, Szollosi J, Vereb G. Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry--approaches and a software solution. *Cytometry A* 2009;75:761-7.
75. Kent UM. Purification of antibodies using protein A-sepharose and FPLC. *Methods Mol Biol* 1999;115:29-33.
76. Koninki K, Barok M, Tanner M, Staff S, Pitkanen J, Hemmila P, Ilvesaro J, Isola J. Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett* 2010;294:211-9.
77. Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 2001;61:4892-900.
78. Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 2015;7:303-10.
79. Tabrizi M, Bornstein GG, Suria H. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. *Aaps j* 2010;12:33-43.
80. Boswell CA, Bumbaca D, Fielder PJ, Khawli LA. Compartmental tissue distribution of antibody therapeutics: experimental approaches and interpretations. *Aaps j* 2012;14:612-8.
81. Palyi-Krekk Z, Barok M, Kovacs T, Saya H, Nagano O, Szollosi J, Nagy P. EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and motogenic effect of CD44. *Cancer Lett* 2008;263:231-42.

82. Baselga J, Cortes J, Im SA, Clark E, Ross G, Kiermaier A, Swain SM. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:3753-61.
83. Ryan Q, Ibrahim A, Cohen MH, Johnson J, Ko CW, Sridhara R, Justice R, Pazdur R. FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *Oncologist* 2008;13:1114-9.
84. Bundred N, Cameron D, Armstrong A, Brunt AM, Cramer A, Dodwell D, Evans A, Hanby A, Hartup S, Hong A and others. Effects of perioperative lapatinib and trastuzumab, alone and in combination, in early HER2+breast cancer - the UK EPHOS-B trial (CRUK/08/002). *European Journal of Cancer*; 2016.
85. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, Rugo HS, Sledge G, Aktan G, Ellis C, Florance A, Vukelja S, Bischoff J and others. Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: final results from the EGF104900 Study. *J Clin Oncol* 2012;30:2585-92.
86. Ahn ER, Wang E, Gluck S. Is the Improved Efficacy of Trastuzumab and Lapatinib Combination Worth the Added Toxicity? A Discussion of Current Evidence, Recommendations, and Ethical Issues Regarding Dual HER2-Targeted Therapy. *Breast Cancer (Auckl)* 2012;6:191-207.
87. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 2009;69:9330-6.
88. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero JM, Schneeweiss A, Heeson S and others. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015;372:724-34.

Hivatkozott és egyéb saját közlemények (DEENK által hitelesített jegyzék)



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/186/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóth Gábor
Neptun kód: L420JU
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038245

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Quantitating ADCC against adherent cells: impedance-based detection is superior to release, membrane permeability, or caspase activation assays in resolving antibody dose response.
Cytom. Part A. 91 (10), 1021-1029, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.23247>
IF: 3.222 (2016)
2. **Tóth, G.**, Szöör, Á., Simon, L., Yarden, Y., Szöllősi, J., Vereb, G.: The combination of trastuzumab and pertuzumab administered at approved doses may delay development of trastuzumab resistance by additively enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.
mAbs. 8 (7), 1361-1370, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2016.1204503>
IF: 4.881
3. Roszik, J., **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Validating pharmacological disruption of protein-protein interactions by acceptor photobleaching FRET imaging.
In: Target Identification and Validation in Drug Discovery. Eds.: Jürgen Moll, Riccardo Colombo, Humana Press, Totowa, NJ, 165-78, 2013.





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

4. Szöör, Á., Ujlaky-Nagy, L., **Tóth, G.**, Szöllősi, J., Vereb, G.: Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms.
Cell. Signal. 28 (2), 81-93, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.11.012>
IF: 3.937

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,04

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,103**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.05.28.



Az értekezés témájához kapcsolódó egyszerűsített TDK előadások, pályamunkák

Helyi TDK előadások

1. Kombinált ErbB ellenes antitest kezelések hatása emlőtumor sejtvonalak proliferációjára (2008/9, különdíj)
2. ErbB2-t szabályozhatóan kifejező sejtvonal, mint trastuzumab target stabilitásának jellemzése (2009/10, I. díj)
3. Impedancia alapú sejtproliferáció mérés alkalmazhatósága monoklonális antitest-terápia modell sejtvonalra gyakorolt hatásának vizsgálatában (2010/11, III. díj)
4. F(ab')₂ fragmentumok készítése humanizált anti-ErbB2 antitestekből, és in vitro hatásvizsgálatuk (2011/12, I. díj)

Országos TDK előadások

1. ErbB2-t szabályozhatóan kifejező sejtvonal, mint trastuzumab target stabilitásának jellemzése (2011, II. díj)
2. F(ab')₂ fragmentumok készítése humanizált anti-ErbB2 antitestekből és hatásvizsgálatuk (2013, I. díj)

TDK pályamunkák

1. Kombinált ErbB ellenes antitest kezelések hatása emlőtumor sejtvonalak proliferációjára (2010)
2. ErbB2-t szabályozhatóan kifejező NIH-3T3 sejtvonal, mint trastuzumab terápiás target-modell jellemzése (2012)
3. Az ErbB2 onkogén hatása a sejtmorfológiára adverz módon befolyásolja az anti-ErbB2 terápia sejtproliferációjára gyakorolt hatásának impedancia alapú vizsgálatát (2012)
4. F(ab')₂ fragmentumok készítése humanizált anti-ErbB2 antitestekből és hatásvizsgálatuk (2013)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni témavezetőmnek, Dr. Vereb György egyetemi tanárnak a témaválasztásért, illetve amiért bevezetett a tudományos kutatómunkába és kutatói életbe. Hálás vagyok, amiért első évfolyamos általános orvostanhallgató korom óta, immáron több mint 10 éve méltónak tart arra, hogy időt és energiát nem spórolva munkámban szakmailag irányít és barátilag mindig maximálisan támogat.

Köszönöm Dr. Szöllősi János akadémikus egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet volt igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra, hogy az intézetben kutatómunkát végezhsek.

Köszönöm Dr. Mátyus László egyetemi tanárnak, a DE ÁOK dékánjának a figyelmét és tanácsait, melyekkel lendületet adott, amikor szükségem volt rá.

Köszönöm Dr. Szőőr Árpádnak a munkában nyújtott segítségét, tanácsait, és mindenekelőtt barátságát, a világmegváltó tervezéseket, és a jó hangulatban eltöltött éveket. Köszönöm neki, hogy megismerhettem világszemléletét.

Hálával tartozom Vágóné Toldi Hajnalkának és Farkasné Sánta Gyöngyinek a kísérletek előkészítésében nyújtott segítségért és tanító készségükért, és mindennapi támogatásukért és végtelen szeretetükért. Köszönöm Pálné Terdik Tündének a mindig jobbító szándékú szavait.

Köszönöm Rebenku Istvánnak, hogy számíthattam rá, ha a kísérletekben segítségre volt szükségem, és örömmel gondolok vissza a PhD-s társként és barátként eltöltött időkre.

Örömmel gondolok vissza a mindig innovatív ötletelésekre és közös munkánkra Katona Tamással.

Köszönöm Dr. Zsebik Barbarának és Dr. Újlaky-Nagy Lászlónak a mikroszkópos mérések során nyújtott segítségüket.

Hálás vagyok, hogy “padtársa” lehettem Dr. Kovács Tamásnak, akivel az intézeti oktatómunkát oly lelkesen csináltuk. Hálás vagyok, hogy együtt dolgozhattam Lajtos Tamással és megismerhettem Dr. Szilágyi Orsolyát, köszönöm barátságukat és szeretetüket. Köszönöm Csomós Istvánnak, Dr. Váradi Tímeának, Volkó Juliannának és Dr. Zákány Florinának a jó hangulatban eltöltött munkanapokat!

Köszönöm Pálfi Évának a tudományos pályázatok során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét és a közös pályázatírás során tanító szándékát és támogatását.

Köszönöm Dr. Simon Lászlónak az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét és tanítását.

Köszönöm Dr. Roszik Jánosnak, hogy TDK-s éveim kezdetén oktatóként segítette munkámat az első sejtproliferációs kísérleteimnél és FRET kiértékeléseknél.

Kutatómunkám a Gedeon Richter támogatásával valósulhatott meg. Az egyetemi doktori értekezés az emberi erőforrások minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának és a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 támogatásával készült.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai