

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Daganatellenes sejtközvetített immunválaszt
módosító vegyületek azonosítása nagy
áteresztőképességű szűréssel**

Guti Eliza

Témavezető: Prof. Dr. Virág László, MD, PhD, DSc



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

**Daganatellenes sejtközvetített immunválaszt módosító vegyületek azonosítása nagy
áteresztőképességű szűréssel**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti Orvostudományok
tudományágban

Írta: Guti Eliza okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt-és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Virág László, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Wiener Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Wiener Zoltán, PhD
Dr. Türk-Mázló Anett, PhD
Dr. Hollandi Réka, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2024. február 6., 13 óra.

Irodalmi áttekintés

A tumorigenezist előidéző molekuláris elváltozások

A proliferatív jelátvitel fenntartása az egyik legfőbb jellemzője a tumorsejteknek. A normál, egészséges sejtek szigorú kontroll alatt tartják sejtszám homeosztázisukat, ami többek között a növekedési faktorok termelését, felszabadítását foglalja magában. A transzformálódott sejtek azonban számos alternatív útvonalon képesek elkerülni ezen regulációt. Ilyen mechanizmus például, hogy maguk termelik saját növekedési faktor receptoraik ligandumait és ezáltal autokrin módon stimulálják reprodukciójukat. Továbbá a rákos sejtek küldhetnek szignálokat a környező sztrómában lévő egészséges társaiknak, hogy növekedési faktorokat szintetizáljanak számukra. Ugyanakkor ismert, hogy a rákos sejt felszínén megjelenő receptorok szintjének fokozásával vagy szerkezeti változásaival hiperszenzitívvé válnak a növekedési faktorok érzékelésére és/vagy ligandum jelenléte nélküli jelátviteli útvonalak bekapcsolására.

A fenotípusos plaszticitás értelmében a sejt tulajdonságai megváltoztatásával adaptálódik a folyamatosan változó környezeti feltételekhez. A tumoros sejtek azonban képesek kikapcsolni ezen funkciójukat és teljesen önállóvá, függetlenné válni a környezetüktől. Az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) a sejtek fenotípusának epiteliálisból mesenchymális típusúvá történő megváltozását jelenti.

Az anyagcsere megváltoztatása is kruciális a rákos sejtek számára azért, hogy képesek legyenek biztosítani a féktelen növekedéshez és osztódáshoz szükséges ATP energiát, molekuláris építőköveket és ráadásul mindezt rövid idő alatt. Mindemellett az oxidatív stressz káros hatásaival szemben is védekeznie kell a sejtnek és mindehhez a transzformálódott sejt metabolikus szinten adaptálódik.

Kimutatták, hogy az apoptózis intrinzik útvonalának defektusa is hozzájárul a korlátlan sejtosztódáshoz. Az olyan DNS mutációkat, amelyek szelektív növekedési előnyt biztosítanak egy-egy sejt számára „driver” mutációknak nevezzük. Ugyanakkor a „passanger” mutációk nem fokozzák a sejt proliferációs képességét, de megtalálhatóak a rákos sejt genomjában. A protoonkogének (pl. PIK3C, MYC, ERBB2) funkcionyeréses mutációja stimulálja a sejtnövekedési, osztódási, valamint túlélési folyamatokat, míg a tumorsuppresszor gének (pl. BRCA1, BRCA2, TP53, PALB2) funkcióvesztéses mutációja szabályozza a DNS hibajavítási, valamint sejtciklus ellenőrzési folyamatokat. Ismert, hogy a hisztonfehérjék N-terminálisán bekövetkező poszt-transzlációs módosítások (metiláció, acetiláció, ubikvitináció, foszforiláció) szintén részt vehetnek a proliferációs, differenciációs vagy sejthalál folyamatokban a hiszton-

metiláz és -demetiláz enzimek közvetítésével. Továbbá a nem-kódoló mikroRNS-ek is hatással vannak a tumorigenezis folyamatára, ugyanis onkogénként is viselkedhetnek.

Az új vér- és nyirokerek kialakításával a daganatsejtek biztosítják saját maguk számára a tápanyagok és oxigén utánpótlását, illetve anyagcsere termékeik elszállítását.

A daganatok progressziójának egyik legfőbb akadálya az immunrendszer legyőzése, azonban a transzformálódott sejtek képesek a gazdaszervezet védekező rendszerét maga mellé állítani, amely az immunoediting jelenségeként vált ismertté. Három fázisát különböztetjük meg, amelyek egymást meghatározott sorrendben követve az alábbiak: elimináció, egyensúly, menekülés.

Emlőtumorokról általánosságban

Az emlőrák a tüdődaganat után a leggyakoribb rákos megbetegedés, míg a nők körében a legelterjedtebb. A mellrák heterogén kórképnek minősül mind molekuláris szinten, mind terápiára adott válaszreakciója alapján. A PAM50 (Prediction Analysis of Microarray 50) teszt 50 gén expressziója alapján öt molekuláris (intrinzik) altípusba – bazális-jellegű, alacsony claudin expressziójú, magas HER2 expressziójú, luminális A- és B típusok – sorolja a primer emlőtumorsejteket. Azonban fehérje szintű, immunhisztokémiai csoportosítás alapján beszélhetünk az úgynevezett helyettesítő – surrogate – osztályozásról.

Az emlődaganatok terápiája

A klinikumban alkalmazott valamennyi terápia elsődleges célja az életet veszélyeztető kórkép teljes egészében való megszüntetése – kuratív terápia –, vagy amennyiben ez nem járható út, az életminőség javítása, illetve meghosszabbítása – palliatív terápia. A klinikai orvostudomány fejlődésével a primer tumorok eltávolítása is nagyban megváltozott, ugyanis napjainkban már lehetőség van emlőkonzerváló műtétekre, szemben a teljes mell eltávolítását jelentő masztektómiával. Az úgynevezett neoadjuváns terápiáról először 1957-ben olvashattak a szakemberek, amelyet eredetileg a nem metasztatikus és nem operálható emlőrák kezelésére fejlesztettek ki. Ezáltal kisebb mértékű beavatkozás is elegendő, ami a gyógyulási időt is nagyban felgyorsítja, illetve a beteg lelki világára is pozitív hatással van, hiszen esztétikailag is szebb végeredmény kapható. Ezzel szemben az adjuváns kemoterápiás szereket a páciens a sebészeti beavatkozást követően kapja.

A rákellenes terápiák egyik csoportjába a nem-célzott sugárterápia sorolható. A sugárterápia indirekten indukál szimpla-vagy duplaszálú DNS töréseket a genomban, míg a víz

radiolízise révén reaktív oxigén származékok keletkezésével oxidatív stresszt vált ki és indirekt módon pusztítja el a sejteket.

A másik csoport képviselői közé sorolandó a targeted terápiás eljárások, a hormon-és immunterápia.

Immunterápia

Monoklonális antitestek

A rákellenes terápiák egyik eszköze a monoklonális antitestek alkalmazása. A monoklonális immunglobulinok olyan ellenanyagok összessége, amelyek ugyanazt az egyetlen epitópot ismerik fel az antigénen. Hatásmechanizmusukat tekintve beszélhetünk a közvetlen eliminálásról azáltal, hogy sejtfelszíni receptorok agonistáiként vagy antagonistáiként viselkedve indukálják a tumorsejt apoptózisát. Ugyanakkor az antitesthez citotoxikus ágensek is konjugálhatók (enzimek, toxin, radioizotóp) és így eredményezik a célsejt pusztulását. Az antitest molekula opszonin funkcióval is rendelkezik, azaz a célsejt felszínén kikötődve opszonizálja – megjelöli – azt és az immunsejtek aktivációját indukálva közvetetten eredményez sejthalált. A sejtfelszíni proteinek epitópokat hordoznak az antitestek számára. Ilyen fehérje lehet a karcino-embriónális antigén (CEA), a mezenchimális epiteliális tranzíciós faktor (MET), epidermális növekedési faktor receptor 1 (EGFR1 vagy ErbB 1), ErbB2 (HER2), ErbB3, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor (IGF1R), adenzin receptor, tumor nekrosis faktor (TNF)-kapcsolt apoptózis-indukáló ligand receptor 1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2 és a nukleáris faktor-kappa B ligand receptor aktivátor (RANKL). A HER2 és VEGF tirozin-kinázként jelátviteli útvonalak résztvevői. A klinikumban 1997 óta alkalmazott monoklonális antitestek humanizált formában vannak jelen azért, hogy maga a terápiás ágens ne váltson ki immunreakciót. Ez azt jelenti, hogy a CDR kivételével humán eredetű az antitest minden frakciója, amelyet rekombináns technikával állítanak elő. Klinikai adatokból ismert, hogy a trastuzumab anti-HER2 antitest csupán a HER2+ emlődaganatban szenvedő páciensek 35 %-nak biztosít megfelelő terápiát.

Bispecifikus antitestek

A bispecifikus antitestek szemben a konvencionális ellenanyagokkal két eltérő antigén-kötőhellyel – két Fab karral – rendelkezik egy azon molekulán belül. Alkalmasak ADCC indukciójára, miáltal az antitest egyik Fab régiója a tumorsejt sejtfelszíni receptorához, míg másik Fab régiója az effektor sejtet ismeri fel és hídként funkcionál közöttük. Ugyanakkor az

emlődaganat terápia részeként alkalmazható, mint számos jelátviteli útvonal inhibitoraként. Igaz, több tanulmány is igazolta, hogy szolid tumorok esetén hatékonysága jóval alacsonyabb, mint a hematológiai malignitással összevetve. A TROP2 sejtnövekedési folyamatokat mediáló fehérje overexpressziója elsősorban a triplanegatív emlőtumor sejtek (TNBC) jellemzője. Bispecifikus antitest alkalmazásával elérhető a TNBC-k T-sejt-függő eliminálása, ugyanis az antitest egyik epitója a T sejt felszíni CD3 molekulája, míg másik a TROP2 sejtfelszíni protein.

Rák elleni vakcina

Számos tanulmány vizsgálja a dendritikus sejt, egész tumorsejt lizátum, RNS/DNS és peptid célpontú neoantigén vakcinák hatékonyságát és biztonságosságát a tumorterápiában. A tumor-asszociált antigének olyan tumorantigének, amelyek a normál, egészséges sejt felszínén is megjelennek, de jóval alacsonyabb mennyiségben. A neoantigének azonban olyan tumor antigének, amelyek a tumorsejtek aminosav-kódoló szekvenciát érintő – nem szinonim – mutációk fehérjetermékei. Mivel ezen fehérjék a normál sejteken nem expresszálódnak, így kiváló terápiás célponttá válnak.

Adoptív sejtherápia

Az adoptív sejtherápia (adoptive cell therapy, ACT) során a betegből tumor-specifikus T-limfocitákat, természetes ölósejteket (natural killer – NK) és dendritikus sejteket izolálnak, felszaporítanak, *in vitro* körülmények között stimulálnak, majd visszajuttatják a szervezetbe. Az ACT elsősorban a citotoxikus CD8⁺ T-limfociták izolálására fókuszál, ugyanis ezek a sejtek sejtölő funkciójukkal azonnal képesek a célpontok eliminálására. A CD8⁺ T-sejtek effektor funkciói közé tartozik a gyulladásos citokinek (TNF- α , IFN- γ) szekréciója, apoptózist indukáló fehérjék (FASL, TRAIL) expressziója, valamint citotoxikus molekulák felszabadításával perforin-mediált sejtlyzisz. Az ACT specificitásának eszköze olyan autológ T-sejtek visszajuttatása a szervezetbe, amelyek T-sejt receptorai CRISPR/Cas9 technikával genetikai módosításon estek át. Az MHC (major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex) – korlátozás alapján a T-sejtek csak azokat a peptid szakaszokat ismerik fel, amelyek MHC molekulákkal alkotnak komplexet. Az ACT hatékonysága úgy is fokozható, hogy a T-sejtek általi felismerés mechanizmusát a kiméra antigén receptort (chimeric antigen receptor, CAR) kifejező limfociták alkalmazásával javítjuk. Így egy gyors és MHC-független T-sejt aktiváció indukálható. Emlőterápiára irányuló klinikai vizsgálatokban ROR1 (receptor tirozin-

kináz orphan receptor 1), NKG2D (natural killer group 2D) és MUC1 sejtfelszíni antigénekre specifikus CAR T-sejteket vizsgáltak.

Trastuzumab hatásmechanizmusa

A humán epidermális növekedési faktor receptorok

A HER1 (ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) és HER4 (ErbB-4) tirozin-kináz aktivitással rendelkező humán epidermális növekedési faktor receptorok. Sejtnövekedési, túlélési, adhézis, migrációs, valamint differenciációs jelátviteli folyamatok szabályozásában vesznek részt. Valamennyi receptor tartalmaz egy ligandumot (növekedési faktor) kötő extracelluláris domént (ECD), egy transzmembrán lipofil szegmenst és egy intracelluláris tirozin-kináz domént (kivéve a HER3). A növekedési faktor extracelluláris doménhez történő kötődése két receptor dimerizációját indukálja. Amennyiben két azonos receptor áll párba, homodimerizációról, viszont, ha két különböző, abban az esetben heterodimerizációról beszélünk. Ez a folyamat teszi lehetővé a tirozin oldalláncok *transz*-autofoszforylációját, ezzel dokkoló felszint biztosítva a downstream jelátvitel során következő elemeinek, amelyek Src homológia-2 (SH2) vagy foszfortirozin-kötő (PTB) doménnel rendelkeznek.

A HER2-pozitív emlőtumorok és a Trastuzumab

A trastuzumab egy humanizált anti-HER2 IgG1 monoklonális antitest, amelyet az FDA 1998-ban engedélyezett HER2-pozitív metasztatikus emlőrákos páciensek kezelésére. A túlzott HER2 expresszió hátterében a gén amplifikációja vagy overexpresszió állhat. A HER2-pozitív emlődaganatokban a *ERBB2* gén akár 25-50 kópiában is jelen lehet, így 40-szer 100-szor több HER2 fehérjetermék keletkezik. Az antitest két antigén-kötő helye a HER2 receptor extracelluláris doménjének juxtamembrán régiójára specifikus. A HER2 receptorból kiinduló útvonalak aktivációját nem csupán receptor dimerizáció válthatja ki, hanem a HER2 monomer metalloproteináz általi enzimatis hasítódása is egy ECD, egy transzmembrán és egy foszforilált tirozin-kináz domén egységre, amely utóbbit p95-nek nevezünk. A membrán-kötött csonka receptor konstitutív aktivációja folyamatosan bekapcsolva tartja a jelátvitelt. A trastuzumab többféle mechanizmus révén képes megakadályozni a HER2 jelátviteli útvonal aktivációját. A metalloproteináz gátlásán keresztül blokkolja a HER2 ECD leválását, továbbá képes megakadályozni a receptorok dimerizációját, illetve a trastuzumab-mediált receptor internalizációját, majd degradációját. Ugyanakkor alkalmas Fc-receptort hordozó immunsejtek általi ADCC kiváltására egyaránt.

Trastuzumab-közvetített ADCC

Az ADCC a veleszületett – természetes – immunrendszer általi vírus és tumor elimináló reakció. Legjellemzőbb effektora a természetes ölősejt – natural killer, NK sejt –, amely a célsejtet annak felszíni receptoraira specifikus antitestek révén ismeri fel, majd lizálja azt. Nevezetesen a target sejtet opszonizáló ellenanyag Fc régiója és az azt felismerő NK sejt-Fc receptorok között kialakuló kötés hozza létre az úgynevezett immunológiai szinapszist (IS), amelynek célja az effektor sejt irányított exocitózisa a target sejt irányába. A szinapszis formáció szigorúan szabályozott lépések sorozata, amelynek eredménye egy jól strukturált, nagyon stabil, szoros sejt-sejt kapcsolat. A cSMAC (central supramolecular activation cluster) tartalmazza az elsődleges, az interakció specifikusságát biztosító molekulákat, míg a pSMAC (peripheral SMAC) az LFA-1 integrin fehérjét. Amennyiben befejeződött a szoros junkció formációja, megindul az effektor sejtekben a mikrotubulus organizáló centrum (MTOC) szerveződése az IS irányába. Az MTOC feladata nyomvonalat biztosítani a perforin és granzim-tartalmú citotoxikus vezikulumok számára, amelyek kinezin és dinein-függő módon közlekednek a mikrotubulusok mentén az IS felé, ahol a granulumok fúzionálnak a plazmamembránnal. Az IS-be került perforinok nagy méretű, transzmembrán pórusokat formálnak utat biztosítva a granzimek számára a célsejt citoszólja felé. A granzimek – granuláris enzimek – sejthalált indukáló szerin proteázok, amelyek közül legnagyobb mennyiségben a granzim A (GzA) és B (GzB) típusok vannak jelen az NK sejtekben. A GzA kaspáz-független sejthalált indukál, míg a GzB kaspáz 3,7 -függő és -független úton is képes kiváltani a target sejt apoptózisát.

Célkitűzés

Az emlődaganatos megbetegedések a nők körében még napjainkban is a vezető halálokok egyike. Számos terápiás eljárás elérhető a betegség kezelésére, például a HER2+ malignitás elleni anti-HER2 monoklonális antitest. A trastuzumab számos mechanizmus révén képes megbénítani a tumorsejt korlátlan burjánzását, amelyek közül az egyik az NK-sejt-függő ADCC. Azonban mi arra kerestük a választ, hogy ez a reprodukálható trastuzumab-alapú rendszer tovább fokozható-e egyéb FDA által jóváhagyott gyógyszerhatóanyag hatásával. Ennek megválaszolására a következő kísérletes lépéseket kívántuk elvégezni:

1. a ko-kultúrát alkotó target és effektor sejtek megfelelő arányának és az inkubációs idő beállítását,
2. az ADCC hatékonyság kvantitálására alkalmas képelemzés-alapú *in vitro* módszer optimalizálását,
3. az ADCC hatékonyságot moduláló vegyületek azonosítását egy FDA molekulakönyvtár szűrésével,
4. az ADCC hatékonyságot befolyásoló „hit” vegyületek validálását szűréstől eltérő technikákkal, valamint
5. a „hit”-ek hatásmechanizmusának jellemzését.

Az ADCC felfedezése 1965-re tehető, így a közel hat évtized alatt igen sok részletre fény derült a mechanizmusról. *In vitro* körülmények között számos technika közül választhatunk, ha az ADCC hatékonyságról szeretnénk képet kapni. Azonban olyan molekuláris biológiai módszer mai napig nem elérhető, ami nagy áteresztő képességű vizsgálatokhoz alkalmazható, azaz nagyszámú vegyület egyidejű tesztelésére alkalmas. Ebből adódóan igyekeztünk az alábbi kihívásokat legyőzni:

1. a lehető legkevesebb emberi közbeavatkozást igénylő ADCC protokoll beállítását, illetve
2. az NK sejt-közvetített citotoxicitás mértékének meghatározását fluoreszcens mikroszkóp használatával.

Módszerek

Sejtvonalak

Valamennyi sejttípus tenyésztése 37 °C-ot, 95 %-os páratartalmat, valamint 5% CO₂-t biztosító inkubátorban történt. A sejtek mikoplazma-mentességét rendszeresen ellenőriztük.

Electric-cell substrate impedance sensing (ECIS) mérés

Az ECIS kísérletek első lépéseként a speciális kialakítású, (8-lyuk 10 aranyelektóddal) lemezeket 1 óráig JIMT-1 médiummal inkubáltam (coating). Ezt követően 10⁵ JIMT-1 sejt/lyuk hozzáadása következett, ugyanis ez a sejtszám eredményezett 24 óra elteltével egy egybefüggő sejtréteget, melyet az impedancia értékekből kirajzolódó exponenciális görbe plató fázisa jelzett. Ekkor trastuzumab antitest (10 µg/ml, humanizált anti-HER-2 monoklonális antitest) és az NK sejtek különböző arányú hozzáadásával (E:T=1:4, 1:2, 1:1 és 2:1) indítottam el az ADCC reakciót. A kontroll lyukakba ugyanakkora térfogatú JIMT-1 médium került trastuzumab és NK sejt jelenléte nélkül. Az impedancia (I) értékeket az ECIS készülék 4000 Hz frekvencián és 4 másodpercenként rögzítette. Az ADCC hatékonyság mértékére az impedancia értékek csökkenéséből következtettünk, amely egyenesen arányos a JIMT-1 sejtek pusztulásával. Számításaimhoz az alábbi képleteket használtam:

$$\text{Impedancia csökkenés: } I_T / I_{T0},$$

azaz minden well impedancia értékét viszonyítottam az ADCC kísérlet 0. időpontjához. Az I az impedancia érték (ohm SI egységben), T az adott időponthoz tartozó I érték.

$$\text{Relatív ADCC hatékonyság} = I_{\text{ADCC}(T)} / I_{\text{NO ADCC}(T)}.$$

ADCC-t moduláló hatóanyagok azonosítása „high-content screening”-gel (HCS)

A 96-lyukú HCS lemezekre JIMT-1 médiumot mértem (50 µl/lyuk). Minden lyukba 10⁴ JIMT-1 sejtet pipettáztam 75 µl térfogatban. 24 órával később a JIMT-1, SKBR-3, MDA-MB468-HER-2 és MKN-7 célsejteket 0,5 µM Calcein-AM festékkel inkubáltam 1 órán keresztül 37 °C-on. A tápfolyadékkal történő mosást követően 50 µl térfogatban kezeltük elő (20 µM, 1 óra, 37 °C) a sejteket az Enzo FDA Approved molekulakönyvtárával a Freedom EVO folyadékkezelő robot segítségével. Ezt követően indítottuk el az ADCC kísérletünket 2x10⁴ festetlen NK sejt és trastuzumab JIMT-1-hez való pipettázásával. Ezáltal a ko-kultúrát 100 µl JIMT-1 médium végtérfogatban, E:T=2:1, 10 µg/ml trastuzumab vagy 2 µg/ml

cetuximab (anti-EGFR antitest, Erbitux), 10 µM koncentrációjú hatóanyagok jelenlétében 3 órán át inkubáltuk. A Calcein-nel festett JIMT-1 sejtek leképezését Opera Phenix High-Content Analysis berendezéssel végeztük az ADCC kezdetén (0 óra) és végén (3 óra) (10x száraz objektív, 0,3 numerikus apertúra, nem-konfokális mód, ex: 488 nm; em: 500-550 nm). Az ADCC hatékonyság mértékét Harmony szoftverrel határoztuk meg az alábbi beállításokkal:

Kalcein-festett JIMT-1 sejtek

A fókuszsíkból lévő Calcein-pozitív JIMT-1 sejtek számát a „Find cells” szoftver modul segítségével határoztuk meg (csatorna: calcein; módszer: B; common threshold: 0,39; area: > 600 µm²; splitting coefficient: 20,4; individual threshold: 0,16; kontraszt: >0,04). Az SKBR-3 és az MDA-MB468-HER-2 sejteket M-módszerrel detektáltuk (átmérő: 40 µm, splitting sensitivity: 0,2; common threshold: 0,2). Az MKN-7 sejtek esetén az M-módszer használatával tudtuk legprecízebben megtanítani a szoftvernek a sejtek hollétét, ami alapján egyértelműsíthető azok azonosítása (átmérő: 40 µm; splitting sensitivity: 0,7; common threshold: 0,19).

JIMT-1 EGFP sejtek

A fókuszsíkból eső EGFP-pozitív objektumok azonosítását a „Find cells” menüpontban állítottuk be (csatorna: EGFP; módszer: M; objektum minimum átmérője 80 µm). Ahol a szoftver sikeresen azonosította az EGFP+ JIMT-1 sejteket, de láthatóan nem tökéletesen a sejthatárok mentén, „Splitting sensitivity” (értéke 0,5) modul segítségével egy nagyobb EGFP+ területet kisebb egységekre osztottuk, illetve a háttérfluoreszcencia intenzitását is korrigáltuk a még pontosabb kép-alapú elemzéshez.

Az ADCC-t túlélő célsejtek százalékos arányát az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$\text{Túlélő sejtek aránya (\%)} = 100 \times (\text{célsejt szám}_{3\text{óra}} / \text{célsejt szám}_{0\text{óra}})$$

Azokat a gyógyszerhatóanyagokat tekintettük „hit”-nek, amelyek legalább 20 %-os eltérést eredményeztek az ADCC hatékonyságban.

LDH vizsgálat

A JIMT-1 sejteket (4000 sejt/lyuk) 96-lyukú plate-be pipettáztam, majd másnap az előkezelés 20 µM sunitinibbel vagy azonos hígítású DMSO-val 1 órán át történt. Ezt követően 8000 NK sejt került minden lyukba 10 µg/ml trastuzumab-tartalmú JIMT-1 médiumban (5% FBS) és a ko-kultúrát 6 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam. Ezután a plate centrifugálásával (250 g, 4 perc) a felülúszót átpipettáztam egy új 96-lyukú plate-re, majd az LDH reagens (felülúszó:LDH reagens = 1:1 = 20 µl/lyuk:20 µl/lyuk) hozzáadása, és 20 perc elteltével az

abszorbancia meghatározása történt Multiskan™ FC Microplate fotométer használatával 450 nm-en. A citotoxicitás mértékét az alábbi képlet segítségével számoltam ki:

$$\text{Citotoxicitás (\%)} = 100 \times (\text{OD}_{\text{E+T+A}} - \text{OD}_{\text{E+T}}) / (\text{OD}_{\text{T lizált}} - \text{OD}_{\text{T}}),$$

ahol “E” az effektor sejtek, a “T” a célsejtek, valamint “T lizált” a lízis pufferrel kezelt JIMT-1 sejtek optikai denzitását (OD) jelenti, míg a “T” a trastuzumab antitestre utal.

A sejtmorfológiai jellemzés

A JIMT-1 sejtek morfológiai változásait 96-lyukú HCS plate-ben végeztük, ahol 4000 sejtet pipettáztam minden lyukba. Másnap a sejtek sunitinibbel történő kezelését követően (20 μM , 1 óra, majd 10 μM , 3 óra), JIMT-1 médiumban hígított 1000-szeresen hígított (5 μM) DRAQ5 fluoreszcens festékkel inkubáltam 30 percen keresztül 37 °C-on, majd mosási lépés nélkül az Opera Phenix High-Content mikroszkóp használatával rögzítettünk felvételeket (20x objektív; 0,4 numerikus apertúra; konfokális mód). A morfometriai analízishez a Harmony szoftvert alkalmaztuk. A sejtszámot a „Find nuclei” opcióval határoztuk meg (csatorna: Alexa 633; módszer: B; common threshold: 0,15; area: > 50 μm^2 ; splitting coefficient: 11,6; individual threshold: 0,35; kontraszt: >0,35). Ezt követően a sejthatárt a „Find cytoplasm” paranccsal határoztuk meg (csatorna: Alexa 633; módszer: A; individual threshold: 0,10). A következő lépésben a „Select Population” menüben (population: nuclei; módszer: common filters) a morfológiai paramétereket listáztattuk a szoftverrel a „Calculate Morphology Properties” menüpontban.

Diszpáz esszé

A JIMT-1 sejtek kezelés hatására bekövetkező adhéziónak a képességét 24-lyukú plate-ben 6×10^4 JIMT-1 sejtet kezeltem 10 μM sunitinib malate-val vagy azonos hígítású DMSO-val 3 órán keresztül 37 °C-on. A felülúszó leszívása után a sejteket jéghideg PBS-sel mostam és 200 μl 0,6 U / ml diszpáz enzimet pipettáztam a lyukakba és 35 percig 37 °C-on inkubáltam. Az enzim eltávolítása után a letapadva maradt sejteket 5x mostam 100 μl PBS-sel és 10 % TCA oldattal fixáltam (4 °C, éjszaka) szulforodamin B (SRB) mérésre. Másnap a plate-t 1x átmostam PBS oldattal, megszáritottam és 0,4 m/v %-os SRB festékkel inkubáltam 10 percig szobahőn. Az inkubáció letelte után 1% ecetsavas mosási lépések következtek, szárítási lépés (sűrített levegővel, addig, amíg teljesen cseppmentessé vált a lyuk, kb. 5 perc), valamint a kötődött festék 1 mM Tris bázis oldatban történő feloldása és 515 nm-en az abszorbancia leolvasása Tecan Spark multimode mikroplate műszerrel.

Intracelluláris granzim B festés

96-lyukú plate-ben 1×10^4 JIMT-1 sejtet festettem DMEM / F12 médiumban hígított $5 \mu\text{M}$ Cell Tracker Blue festékkel 30 percen keresztül 37°C -on. Ezután a sejteket 2x mostam DMEM / F12 médiummal, majd 1 órán át előkezelttem $20 \mu\text{M}$ sunitinibbel ($50 \mu\text{l/lyuk}$). Az ADCC kísérletet az előkezelést követően indítottam el 2×10^4 NK sejt és $10 \mu\text{g/ml}$ -tartalmú trastuzumab JIMT-1 médium célsejtekhez történő hozzáadásával ($c_{\text{sunitinib}} = 10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{l/lyuk}$). A kultúrát 3 órán át inkubáltam, majd tripszin / EDTA-s emésztéssel összegyűjtöttem és PBS-sel mostam. A festett JIMT-1 és festetlen NK sejteket ezután 4 %-os formalinban fixáltam (10 perc, szobahő) és 0,1 %-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltam (10 perc, szobahő). A mintákat 1 %-os BSA oldatban blokkoltam 1 órán át, majd anti-granzim B Alexa Fluor 647 antitesttel inkubáltam 20 percig szobahőn, sötétben. A granzim B-pozitív JIMT-1 sejtek számát NovoCyte áramlási citométerrel vizsgáltam.

Citokin szekréció vizsgálata ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel

2×10^5 CD16.176 V.NK-92 sejtet ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$ trastuzumab-mentes vagy - tartalmú) NK médiumban $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ HER-2-Fc-vel bevont 96-lyukú plate-ben inkubáltuk 24 órán át, melyet sunitinib hatóanyaggal is kiegészítettünk ($0,01 - 30 \mu\text{M}$). Az egynapos kezelést követően a sejtmentes felülúszóból az interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) koncentrációját ELISA módszerrel mértük.

Sejtciklus elemzés

A JIMT-1 sejtek tripszines felválasztását követően jéghideg 70 %-os etanolban fixáltam 30 percig 4°C -on. A sejtek PBS-sel történő mosása után 1 mg/ml RNáz enzimmal inkubáltuk (30 perc, 37°C), majd $5 \mu\text{M}$ DRAQ5 festékkel festettük 30 percig, szobahőn. A DNS mennyiséget NovoCyte áramlási citométerrel határoztuk meg.

Western blot

A JIMT-1 sejteket egyszeri PBS-es mosási lépést követően $150 \mu\text{l}$ RIPA pufferbe gyűjtöttem, melyet 1 % PMSF-el és 1 % PIC-el egészítettem ki. A sejteket szonikálással tártam fel, majd a felülúszót centrifugálással gyűjtöttem össze. A fehérje koncentrációját Direct Detect spektrofotométerrel határoztam meg. A fehérjemintát SDS mintapufferben 95°C -on 10 percig főztem, majd 12 %-os SDS-tartalmú denaturáló poliakrilamid gélen $20 \mu\text{g}$ fehérjét szeparáltam méret szerint (80 V, 15 perc; 100 V, 70 perc). A fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (blottoltuk; 400 mA, 90 perc). Ezt követően a membránokat 5 %-os sovány

tejporban blokkoltam (1 óra, szobahő). Az elsődleges antitesteket 1 %-os sovány tejporban hígítottam és 1 éjszakán át, 4 °C-on billegtetőn inkubáltam. Másnap a membránokat 0,1 %-os Tween20-tartalmú TBS pufferen mostam (3x10 perc, szobahő), majd a HRP-konjugált másodlagos antitesteket 1 %-os sovány tejporban hígítottam és 1 órán keresztül billegtetőn hagytam. Az Akt kimutatásához a pAkt antitestet enyhe strippeléssel távolítottam el, majd a blokkolási lépéstől megismételtem a procedúrát az anti-Akt antitesttel. A membránok mosását követően az ún. előhívási lépést ECL-alapú Chemidoc Imaging műszerrel végeztem és ImageJ szoftverrel kvantitáltuk.

EGFP- t (Enhanced Green Fluorescent Protein) kifejező JIMT-1 sejtek előállítás

A 80-90%-os konfluenciájú HEK293 sejteket az alábbi négy plazmiddal (10 µg, 1:1:1:1:1): pLP-1, pLP-2, pLP-VSV-G és pWOX -EGFP transzfektáltuk Lipofectamine 3000 kit segítségével. A sejtek felülúszóját 24 óra elteltével lecseréltük, majd a lentivírust tartalmazó médiumot 48 órával a transzfekciót követően összegyűjtöttük, 0,45 µm-es szűrőn átszűrtük és 8 µg / ml polibrénnel együtt a JIMT-1 sejtekhez adtuk. Öt nappal a vírusos transzdukció után az EGFP-t kifejező sejteket FACS segítségével válogattuk ki és tenyésztettük tovább, illetve fagyasztottuk le.

Sejthalál vizsgálata 3D JIMT-1 szferoid modellben

2x10³/lyuk JIMT-1-EGFP sejtet 96-lyukú plate-be helyeztünk, melyet előzetesen 0,5 %-os agaróz oldattal vontunk be, hogy egy U-aljú sejttaszító felületet kapjunk és 3 napon keresztül folyamatosan ellenőriztük a szferoidok megjelenését (méret, alak). A kialakult szferoidokat üveg-aljú Cell Carrier-Ultra 96-lyukú plate-re transzferáltuk, melyet korábban 0,5 % -os Pluronic-F127-oldattal inkubáltunk (45 perc, szobahő). A JIMT-1 szferoidokat 20 µM sunitinib-bel kezeltük elő 1 órán át, majd a 10 µM Cell Tracker Blue-val megfestett NK sejtek (E:T = 20:1), valamint a trastuzumab ellenanyag (10 µg/ml) hozzáadásával elindítottuk az ADCC kísérletet (24 óra, 37 °C). 24 óra elteltével a ko-kultúrát Annexin V-Alexa Fluor 647 fluoreszcens konjugátummal inkubáltuk (1 óra, 37 °C). A mikroszkópos felvételeket Opera Phenix konfokális mikroszkóppal rögzítettük (10x objektív; 0,3 numerikus apertúra, konfokális mód; EGFP: ex. 488 nm, em. 500-550 nm; Alexa647: ex. 640 nm, em. 650-760 nm). A felvételeket a Harmony szoftverrel elemeztük az alábbiakban felsoroltak alapján. A szferoidokat a JIMT-1 sejtek EGFP fluoreszcenciája alapján azonosítottuk a „Find texture” opcióval, valamint méret szerinti szűréssel (> 25 000). A látótér széli objektumokat a „Select

population” menüpont segítségével távolítottuk el az elemzésből. Az Annexin festődésű (apoptotikus) sejtek a szferoidok periférikus régióiban tűntek fel, ezért az ún. apoptotikus gyűrű régióban megmértük az Annexin fluoreszcencia intenzitását a „Select region” (külső határ – 90%) modul segítségével.

Intracelluláris LC3B festés

A JIMT-1 sejteket (1×10^4 sejt/lyuk) a kezeléseket követően PBS-sel mostam, majd 20 °C-os metanollal inkubáltam 30 percen át. A fixálás után, a sejteket mostam, majd 0,1 %-os Triton X-100 oldattal permeabilizáltam (10 perc, szobahő), később 1 %-os BSA-ban blokkoltam (1 óra, szobahő). Az anti-LC3B ellenanyaggal (500x 1% BSA-ban) 1 éjszakán át inkubáltam a sejteket 4 °C-on. Másnap a mosási lépéseket követően 1 % BSA-ban hígított 1 µg / ml DAPI-val és másodlagos antitesttel (kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 647, 1000x) inkubáltam (1 óra, szobahő, letakarva) a sejteket. A mikroszkopizálást Opera Phenix konfokális mikroszkóppal végeztem (40x immerziós objektív; 1,1 numerikus apertúra; DAPI: ex. 405 nm, ex. 435-480 nm; Alexa647: ex. 647; em. 650-760 nm). A sejtenkénti spot-ok számát az alábbi beállításokkal határoztuk meg Harmony szoftverrel. Első lépésben a sejteket a DAPI festődés alapján azonosítottuk a „Find nuclei” menüpontban (csatorna: DAPI; C mód; common threshold: 0,2; area: $> 60 \mu\text{m}^2$; splitting coefficient: 9,0; individual threshold: 0,2; kontraszt: 0,15; output population: nuclei). A „Filter image” opciót használva a háttér intenzitást csökkentettük (csatorna: Alexa647; mód: Smoothing; filter: Gaussian; width: 10 px; output image: smoothed 647). A sejthatárokat a „Find cytoplasm” menüpontban azonosítottuk (csatorna: Smoothed 647; mód: F; membrán csatorna: Plane Map Alexa488; individual threshold: 0,05). A látótér szélére eső objektumokat „Select population” (populáció: nuclei; mód: common filters with deletion the border objects; region: cell) is eltávolítottuk. A spot-kat a „Find spots” modullal azonosítottuk (csatorna: Alexa647; ROI: cells [removed border objects] and cell; mód: C; radius: ≤ 4 px; kontraszt: $> 0,18$; uncorrected spot to region intensity: $> 1,7$; távolság: ≥ 1 px; spot peak radius: 0,5 px with calculate spot properties; output population: spots). Végezetül a spot-ok fluoreszcencia intenzitását határoztuk meg a „Calculate intensity properties 1,2 and 3” (csatorna Alexa 647; populáció: cells (removed border objects), region: spots [1]; spot maxima [2] és spot borders [3]; mód: standard [1, 2, 3]; quantile fraction 50%).

HER-2 immunfestés

A JIMT-1 médiummal bevont 96-lyukú HCS plate-be 1×10^4 /lyuk JIMT-1 sejtet $20 \mu\text{M}$ sunitinibbel kezeltem elő 1 órán át, melyet $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ Alexa Fluor647-konjugált trastuzumab-tartalmú médiummal $10 \mu\text{M}$ koncentrációra hígítottam és 3 órán keresztül hígítottam. Az inkubáció után a sejtek PBS-es mosáson, majd fixáláson (4 % formalin, 10 perc, szobahő) estek át. A permeabilizálási lépésben - 20°C -os 100 % metanolban álltak a sejtek 10 percig. Az alkohol eltávolítása után 1 %-os BSA oldattal történő blokkolás következett (1 óra, szobahő), majd az elsődleges anti- β -aktin ellenanyaggal (5000x, 1 óra, szobahő) való inkubálás. A nem kötődött antitesteket mosási lépéssel távolítottam el, amely után a másodlagos anti-egér Alexa Fluor488 (1000x) antitesttel inkubáltam a sejteket 1 órán át. Újabb mosási lépést követően DAPI ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$, 10 perc, szobahő, letakarva) festéssel jelöltem a sejtmagokat, amely után szintén egy mosási lépés következett. A felvételeket Opera Phenix HCS mikroszkóppal végeztük (20x levegős objektív; 0,4 numerikus apertúra, nem-konfokális mód).

Statisztikai elemzés

Az adatokat legalább három egymástól független kísérlet eredményei alapján mutatom be (átlag $\pm$ SEM). A normalitás-elemzéshez a Shapiro-Wilk tesztet használtuk. Amennyiben az adatok nem mutattak normális eloszlást, Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk Dunn-féle poszt-hoc tesztel. Ahol normális eloszlásúak voltak az adatok, egyutas ANOVA-t használtunk Sidak- vagy Dunnett-poszt-hoc tesztel kiegészítve, míg kétutas ANOVA esetén Tukey-poszt-hoc tesztet. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns eltérésnek. Valamennyi statisztikai analízist GraphPad Prism 8.0.1 szoftverrel (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) végeztük.

Eredmények

ADCC paramétereinek beállítása ECIS módszerrel

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott effektor - target sejt arányok (E : T=1:4, 1:2, 1:1 és 2:1)) eltérő, ugyanakkor szignifikáns ADCC hatékonyságot eredményeztek. Továbbá azt is megtudtuk, hogy elegendő a 3 órás inkubációs időn belül maradnunk.

HCS esszé optimalizálása ADCC vizsgálatára

Bár az ECIS nagy szenzitivitással rendelkező, megbízható mérőműszer, az intézetünkben lévő készülék csupán 16 well-es kísérletekre alkalmas. Ezért az ECIS során alkalmazott kísérletes paramétereket átültettük egy high-throughput screening-re (HTS) optimalizált mikroszkóprendszerre. Az ADCC hatékonyságot ezáltal kép-alapú elemzéssel végeztük, ahol a JIMT-1 sejteket kalcein-acetoximetil (kalcein-AM) festékkel jelöltük, míg az NK sejteket festetlenül adtuk a ko-kultúrához. A statisztikai kiértékelés alapján elmondhatjuk, hogy 2:1 E:T arány 3 óra alatt eredményezett olyan mértékű JIMT-1 sejt pusztulást, amelyet felhasználva ADCC aktivátorokat vagy inhibitorokat is azonosíthatunk a szűrés alkalmával.

ADCC hatékonyságot csökkentő hatóanyagok azonosítása high-content screening (HCS) esszével

A HCS esszé alatt egy 774 gyógyszerhatóanyagot tartalmazó molekula könyvtárral inkubáltuk az ADCC ko-kultúránkat. Az NK sejtek szignifikáns JIMT-1 sejthalált indukáltak (a 10 plate-ben mért sejthalál átlaga 56 %). Hat komponens váltott ki önmagában (NK sejt hozzáadása nélkül) 20 %-nál magasabb JIMT-1 citotoxicitást. Ezen túlmenően egyik vizsgált vegyület sem fokozta az ADCC hatékonyságot a DMSO oldószer kontrollhoz képest, azonban négy vegyület (hit; vinkrisztin, kolhicin, podofillotoxin és sunitinib) nyújtott legalább 20 %-os védelmet az ADCC-vel szemben.

Az ADCC hatékonyság mértékét csökkentő hit-ek gátló hatásának megerősítése kalcein festéssel

A szűrés megbízhatóságának ellenőrzése érdekében megerősítő méréseket végeztünk az ADCC inhibitoraival. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy mind a négy gyógyszerhatóanyag gátló hatása reprodukálható (10 μ M koncentráció).

A HCS-alapú ADCC esszé továbbfejlesztése EGFP-t kifejező célsejtek alkalmazásával

Tizenkilenc különböző vegyület – valamint DMSO, mint oldószer kontroll – négy példányban volt jelen a 96-lyukú plate-n. A hatóanyagok között szerepelt az a három mikrotubulus gátlószer (colchicine, vincristine and podophyllotoxin) is – az esszé pozitív kontrolljainként –, amelyeket ADCC-t gátló szerként azonosítottunk a kalcein-festésen alapuló HCS kísérleteinkben.

A transzdukált JIMT-1 sejtek 488 nm-es hullámhosszon történő gerjesztésük alapján egyértelműen elkülöníthetők a nem-fluoreszkáló NK sejtektől. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az NK sejtek-indukálta sejtpusztulás (50 % „+ NK csoportban) reprodukálhatóan detektálható az általunk optimalizált rendszerben. A megismételhetőségre a három korábban már „hit”-ként azonosított mikrotubulus gátlószer újbóli azonosítása enged következtetni, ugyanakkor önmagában egyik szer sem indukált citotoxikus reakciót a „– NK” csoportban.

A HCS kísérletek közös jellemzője, hogy a szűréssel azonosított vegyületek hatásának megerősítését egy eltérő technikával kell igazolni ⁹⁴. Ehhez az ADCC kvantitálása használt gond standard módszert, az ECIS-t választottuk a korábban már ismertetett kísérletes paraméterekkel. Valamennyi esetben 2 : 1 E :T arány 50 % körüli JIMT-1 apoptózist eredményezett, amely a „hit”-ek jelenlétében markánsan visszaesett.

A sunitinib hatásának megerősítése LDH és ECIS módszerekkel

A mikrotubulus organizációt megbénító szerekről szerzett ismereteink alapján, úgy döntöttünk, hogy a későbbiekben a több célpontú tirozin-kináz inhibitor, a sunitinib gátló hatásának tanulmányozására fókuszálunk. Első lépésben a szűrési protokoll használatával ellenőriztük a szer inhibitor hatásának reprodukálhatóságát. A mérési adatok nem csupán a gátló hatást erősítették meg, hanem egy koncentráció-függő ADCC hatékonyságot igazoltak. A kalcein festésen túl LDH felszabadulást mérő, illetve ECIS technika segítségével is igazoltuk az ADCC reakció során tapasztalható JIMT-1 sejt rezisztenciát sunitinib kezelés mellett. A laktát-dehidrogenáz enzim valamennyi sejtünk citoplazmájában fellelhető, amely a sérült membránon keresztül kijut a sejtől, így *in vitro* kísérletes körülmények között felülúszóból detektálható. Az LDH, illetve az impedancia-alapú ECIS módszer is egyértelműen kimutatta a sunitinib jelenlétében megfigyelhető csökkenést az ADCC hatékonyságban.

A sunitinib az ADCC pán inhibitora

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a sunitinib hatása nem korlátozódik-e egyetlen célsejtvonalra (JIMT-1), ezért további három HER2-pozitív tumorsejtvonalon is elvégeztük a trastuzumab-közvetített ADCC reakciót. Az SKBR3, valamint az MKN7 sejtvonalak endogén, míg az MDA-MB-468 sejtvonal exogén HER2-pozitivitásúak. A célsejtek életképességét kalcein-festéssel és HCS mikroszkóppal mértük. Az adatok kiértékelését követően kijelenthetjük, hogy a sunitinib inhibitor hatása nem JIMT-1 sejt specifikus.

Arra is szerettünk volna választ kapni, hogy a korábban tapasztalt gátló hatás megfigyelhető-e abban az esetben, ha anti-EGFR ellenanyaggal indukáljuk az ADCC-t, ezért végeztünk olyan in vitro kísérletet is, ahol cetuximab antitesttel inkubáltuk a JIMT-1 és NK sejtekből álló ko-kultúrát. A kalcein-festéssel jelölt JIMT-1 sejtek számát fluoreszcens mikroszkóppal határoztuk meg, amelynek eredménye alapján megbizonyosodhattunk arról, hogy a gátló hatás továbbra is fennáll.

A sunitinib gátolja az NK sejtek aktivációját

Az ADCC reakcióban a granzim B az egyik olyan citotoxikus molekula, amely az NK sejtek granulumaiból irányított exocitózissal az immunológiai szinapszisba ürül. Ezért áramlási citometriával megvizsgáltuk, hogy a sunitinib befolyásolja-e ezen a granzim B felszabadulását. Méréseink alapján elmondható, hogy a granzim B bejut a JIMT-1 sejtekbe, továbbá a sunitinib csökkentette a granzim B-pozitív JIMT-1 sejtek arányát a ADCC-DMSO kontrollhoz képest.

Ismert, hogy az NK sejtek által szekretált interferon- γ (IFN- γ) citokin számos immunológiai reakciót indít el. Az IFN- γ felelős ugyanis a daganatos sejtek proliferáció gátlásáért vagy akár apoptotikus folyamatok elindításáért. Ezért az NK sejtek IFN- γ – mint aktivációs marker – szekrécióját ELISA technikával vizsgáltuk. Az ADCC-t trastuzumab-HER-2-Fc komplex-szel indukáltuk a target JIMT-1 sejt jelenléte nélkül. A kolorimetriás mérés eredménye alapján kijelenthető, hogy a sunitinib gátolta az NK sejt aktivációra utaló citokin szekrécióját, ami azt jelenti, hogy a gátló hatás összecseng az áramlási citometriai eredményeinkkel.

Elvégeztünk olyan kísérletet is, ahol csak a JIMT-1 vagy az NK sejt kapott kezelést, majd mosási lépés után indítottuk el az ADCC ko-kultúrát. Az ADCC hatékonyságát kalcein-festéses mikroszkópos eljárással követtük nyomon.

A sunitinib módosítja a JIMT-1 sejtek fenotípusát és adhéziós képességét

Miután az adhéziós szignalizáció befolyásolhatja a sejthalál folyamatok szabályozását, felmerül, hogy a sunitinib ennek révén is beavatkozhat az ADCC reakcióba. Ezért a sunitinibbel kezelt JIMT-1 sejteket Draq5 fluoreszcens festékkel jelöltük, majd HCS mikroszkóppal vizsgáltuk a morfológiai elváltozást. A DRAQ5 egy membrán permeábilis, duplaszálú DNS-hez sztöchiometrikusan kötődő fluoreszcens festék, amely a gyártócég szerint jóval kisebb affinitással, de kötődik az RNS-hez is. Mivel a citoplazma bővelkedik RNS-ben, így azt megfestve, vizsgálható a sejt morfológia megfelelő gerjesztés mellett. Méréseink rávilágítottak arra, hogy a sunitinib szignifikáns sejtméret növekedést indukál.

Továbbá megvizsgáltuk, hogy a hogyan változik a ADCC target sejtjeinek adhéziója sunitinib kezelés hatására. A kísérlet során a sunitinibbel inkubált JIMT-1 sejteket diszpáz emésztéssel egybekötött SRB esszével vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a kezelés következtében markánsan több JIMT-1 sejt tapadt a lemez felszínéhez.

A sunitinib kezelés csökkenti a sejtfelszíni HER-2 kifejeződését

A trastuzumab-függő NK sejt ADCC egyik kulcsmolekulája a HER2 sejtfelszíni receptor. Ebből következik, hogy a HER2 sejtfelszíni denzitása nagymértékben befolyásolja az ADCC hatékonyság mértékét. Mivel ismert a receptor recirkuláció jelensége^{93,94,95,96,97}, amelynek lényege, hogy a sejt folyamatosan „utaztatja” a receptorait a sejtfelszíni és a citoplazmatikus régiók között, felmerült bennünk annak lehetősége, hogy a sunitinib felgyorsítja a HER2 receptor internalizációját, ezzel csökkentve a trastuzumab sejtfelszíni targetjét, amely végül az ADCC előli meneküléshez vezet. Ennek kiderítésére a JIMT-1 sejtek HER2 lokalizációját immuncitokémiai vizsgálattal tanulmányoztuk. A kísérlet során Alexa Fluor 647 festékkel konjugált trastuzumab antitesttel inkubáltuk a JIMT-1 sejteket, amely kimutatta a sejtek HER-2 expresszióbeli heterogenitását, ugyanis a mikroszkópos felvételek markáns csökkenést jeleztek a sejtfelszíni receptor denzitásban. Ugyanakkor Western blot-tal igazoltuk, hogy a sunitinib-nek nincs hatása a totál HER-2 expresszióra.

A sunitinib gátolja a sejt ciklust

A HER2 az epidermális növekedési faktor receptorcsalád tagja, amely a sejtosztódást irányító jelátviteli útvonal első résztvevője. Amennyiben redukálódik a sejtfelszíni HER2 receptorok száma, belátható, hogy a sejtproliferáció mértéke is visszaszorul. Ezért megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott sunitinib koncentráció és inkubációs idő, eredményez-e bármiféle változást a sejt ciklusban. A sunitinib kezelést követően, a JIMT-1

sejtek DNS mennyiségét RNáz A enzimmal, majd DRAQ5 duplaszálú DNS-t jelölő fluoreszcens festékkel inkubálva, áramlási citométerrel vizsgáltuk. Méréseink rávilágítottak arra, hogy az ADCC során alkalmazott 4 órán át tartó inkubációs idő nem befolyásolja a sejtek osztódását. Azonban a 24 órás kezelés már megemeli a G0/G1 fázisban rekedt JIMT-1 sejtek, ugyanakkor csökkenti az S szakaszban lévő tumorsejtek számát (4 óra sun – 24 óra sun).

A sunitinib autofágiát indukál a JIMT-1 sejtekben

Irodalmi adatokból ismert, hogy az autofágia egy lehetséges menekülési útvonal az NK sejt-mediált sejtlyízis elől. Az ADCC során ugyanis az immunológiai szinapszisba ürülő természetes ölósejt-eredetű granzim b degradálódik a target sejten belül az autofagoszomális úton. Ezért megvizsgáltuk, hogy a sunitinib vajon indukál-e autofágiát a JIMT-1 sejtekben. Az LC3B-II az autofágia markere, amely a citoszolikus LC3B-I és a foszfatidil-etanolamin konjugációjával jön létre és a kialakuló autofagoszómák felszínén foglal helyet. Az LC3B-II markert western blot technikával vizsgáltuk, ami kimutatta, hogy sunitinib-kezelt sejtekben megemelkedett az LC3B-II mennyisége. Az autofagoszómákat az immuncitokémiai mikroszkópos felvételeken is láthatjuk, amelyeket az LC3B-II pontok jelölnek. Az elemzés alapján elmondhatjuk, hogy a sunitinib kezelés hatására az LC3B-II-pozitív objektumok száma markánsan megemelkedett.

A sunitinib ADCC rezisztenciát biztosít 3D szferoid modellben

A 3D *in vitro* kísérletek némiképp közelebb állnak az *in vivo* helyzethez, mint a 2D sejt kísérletek. Ezért transzdukciós és transzfekciós lépésekkel EGFP-t expresszáló JIMT-1 sejteket hoztunk létre, amelyeket szferoidok tenyésztésére használtunk fel. Az NK sejtek hozzáadása a JIMT-1 szferoidokhoz a tumorsejtek pusztulását eredményezte, hasonlóan a 2D ko-kultúra esetén. A sejthalál mértékét Annexin V festődés alapján határoztuk meg mikroszkópos felvételekről. Az apoptotikus sejtek (Annexin V-pozitív) a szferoidok periférikus régiójában csoportosulnak, ezáltal egy gyűrű régiót kialakítva. A szferoid kezelése sunitinib-bel csökkentette az Annexin V-festődésű sejtek megjelenését a 3D objektumokban.

Irodalmi adatok támasztják alá, hogy az integrinek az adhézión túl lényeges szerepet töltenek be a sejt túlélési folyamataiban. Köztudott ugyanis, hogy emlődaganatos kórképekben az integrin jelátvitel gátlása az apoptotikus folyamatok megakadályozását idézi elő. Ezen adatokból kiindulva, kíváncsiak voltunk arra, hogy ha az adhézión szignalizáció gátlása, az megszünteti-e a sunitinib-okozta rezisztenciát az ADCC reakcióval szemben. A sejtenyésztő edényeket Pluronic F-127 oldattal vontuk be, amely megakadályozza az adherens

sejtek letapadását. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy nincs különbség az adherens és a szuszpenziós ADCC hatékonyságot illetően, ugyanis a sunitinib gátló tulajdonsága továbbra is tapasztalható.

A sunitinib nem indukált Akt foszforilációt a JIMT-1 sejtekben

A receptor tirozin kinázok (RTK) a daganatos kórképek kialakulásának kulcsfontosságú útvonalának résztvevői, mivel a proliferációs, túlélési és növekedési celluláris eseményeket irányítják. Az Akt egy szerin/treonin specifikus protein kináz, amely az RTK útvonal közvetítője. Ugyanakkor azt is tudjuk, hogy az Akt fehérje az integrinek által elindított jelátviteli folyamatok centrális regulátora is. A fehérje aktivációjára annak foszforilált formájának megjelenése utal, amit Western blot módszerrel vizsgáltunk. Eredményeink bizonyították, hogy a sunitinib kezelés nincs hatással az Akt foszforilációra.

Összefoglalás

Az NK sejtek által végrehajtott ADCC egyik legjelentősebb mechanizmusa a trastuzumab-függő HER2+ emlőrák sejtek eliminálása. A disszertációm alapjául szolgáló közlemények molekulakönyvtár szűrésére alkalmas, *in vitro* ADCC modell optimalizására és jellemzésére irányultak. Ezen túlmenően szeretnénk volna jobban megérteni az ADCC-t befolyásoló mechanizmusokat.

A 774 FDA által engedélyezett vegyület – a jelöletlen effektor NK sejtek és kalceinnel megfestett JIMT-1 célsejtekből álló ko-kultúra – HCS technikával történő tesztelésével, négy olyan hatóanyagot sikerült azonosítani, amelyek csökkentették az ADCC hatékonyságát. Ugyanakkor hét molekula esetén tapasztaltunk JIMT-1 sejtekre irányuló citotoxicitást. A kolkicin, a podopfillotoxin és a vinkrisztin mikrotubulus polimerizációt gátló szerek, ami magyarázza a tapasztalt ADCC gátló hatást. Az inhibitorok ugyanis blokkolják az immunológiai szinapszis létrejöttét, továbbá szintén negatív hatást gyakorolnak az intracelluláris vezikuláris transzport folyamatokra, így az exocitotikus lépésekre is. Az irodalmi adatok alapján a negyedik hatóanyagra fókuszáltunk, amely a több célpontú receptor tirozin-kináz inhibitor (RTKI), a sunitinib. A sunitinib JIMT-1 sejtekre gyakorolt citoprotektív hatását LDH felszabadulás mérésével és ECIS módszerrel is igazoltuk. Az RTKI ADCC-re gyakorolt gátló hatását sikerült további HER2+ sejtvonalakon, illetve anti-HER1 antitest jelenlétében is alátámasztani. Ez mind arra utal, hogy megfigyeléseink nem korlátozódnak csupán a JIMT-1 sejtre vagy a HER2 receptorra. Az NK sejtfunkciókat granzim b felszabadulásuk és IFN- γ szekréciójuk alapján vizsgáltuk, és mind a két esetben csökkent aktivációt detektálhattunk. Kísérleteinkkel rávilágítottunk a sunitinib fenotípust moduláló, HER2 sejtfelszíni kifejeződését csökkentő, valamint autofágiát indukáló hatásaira is. Ugyanakkor a sunitinib gátolta a JIMT-1 sejtek apoptózist 3D szferoid modellben, illetve szuszpenziós ADCC ko-kultúrában is.

Az ADCC-t befolyásoló hatóanyagok azonosítására szolgáló továbbfejlesztett HCS esszében EGFP-vel transzdukált JIMT-1 sejtekkel dolgoztunk. Célunk az volt, hogy a lehető legkevesebb emberi tényező befolyásolja az ADCC-t, amelynek majdnem minden lépése automatizált beleértve a kezelési és elemzési lépéseket.

Összefoglalva elmondhatom, hogy a kalcein festésen alapuló módszerrel azonosítottunk egy új ADCC-t gátló szert, a sunitinibet. Ennek jelentősége az, hogy a sunitinib negatívan befolyásolhatja a trastuzumab által közvetített ADCC terápiát emlődaganatos betegeknél. Ugyanakkor az EGFP-t expresszáló célsejtek detektálására épülő módszerrel kidolgoztunk egy egyszerűbb, gyorsabb és megbízható új ADCC szűrési technikát.



**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/398/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Guti Eliza

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Guti, E.**, Bede, Á. M., Váróczy, C., Hegedűs, C., Demény, M. Á., Virág, L.: High-Content Screening Assay for the Identification of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Modifying Compounds.
JoVE. 198, 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/64485>
IF: 1.2 (2022)
2. **Guti, E.**, Regdon, Z., Sturniolo, I., Kiss, A., Kovács, K., Demény, M. Á., Szöör, Á., Vereb, G., Szöllősi, J., Hegedűs, C., Polgár, Z., Virág, L.: The multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib induces resistance of HER2 positive breast cancer cells to trastuzumab-mediated ADCC.
Cancer Immunol. Immunother. 71 (9), 2151-2168, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-022-03146-z>
IF: 5.8

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7

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

Debrecen, 2023.08.29.

