

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Guti Eliza

Témavezető: Prof. Dr. Virág László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Doktori disszertációmát Édesanyámnak és Édesapám emlékének ajánlom.

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék	3
2	Rövidítések jegyzéke	5
3	Bevezetés	10
4	Irodalmi áttekintés	11
4.1	Onkológiai alapfogalmak	11
4.2	A tumorigenezist előidéző molekuláris elváltozások	12
4.3	Emlőtumorokról általánosságban	14
4.4	Az emlődaganatok terápiája	18
4.4.1	Sugár-és kemoterápia	19
4.4.2	Immunterápia	20
4.4.3	Trastuzumab hatásmechanizmusa	25
5	Célkitűzés	31
6	Anyagok és módszerek	32
6.1.1	Anyagok	32
6.1.2	Pufferek	34
6.2	Módszerek	35
6.2.1	<i>Sejtvonalak</i>	35
6.2.2	<i>Electric-cell substrate impedance sensing (ECIS) mérés</i>	35
6.2.3	<i>ADCC-t moduláló hatóanyagok azonosítása „high-content screening” (HCS) módszerrel</i>	36
6.2.4	<i>LDH vizsgálat</i>	37
6.2.5	<i>A sejtmorfológiai jellemzés</i>	38
6.2.6	<i>Diszpáz esszé</i>	38
6.2.7	<i>Intracelluláris granzim B festés</i>	39
6.2.8	<i>Citokin szekréció vizsgálata ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) módszerrel</i>	39
6.2.9	<i>Sejtciklus elemzés</i>	39
6.2.10	<i>Western blot</i>	39
6.2.11	<i>EGFP- t (Enhanced Green Fluorescent Protein) kifejező JIMT-1 sejtek előállítása</i>	40
6.2.12	<i>Sejthalál vizsgálata 3D JIMT-1 szferoid modellben</i>	40
6.2.13	<i>Intracelluláris LC3B festés</i>	41
6.2.14	<i>HER-2 immunfestés</i>	42
6.2.15	<i>Statisztikai elemzés</i>	42
7	Eredmények	43
7.1	ADCC paramétereinek beállítása ECIS módszerrel	43

7.3	ADCC hatékonyságot módosító hatóanyagok azonosítása high-content screening (HCS) esszével	46
7.4	Az ADCC hatékonyság mértékét csökkentő hit-ek gátló hatásának megerősítése kalcein festéssel.....	48
7.5	A HCS-alapú ADCC esszé továbbfejlesztése EGFP-t kifejező célsejtek alkalmazásával.....	49
7.6	A sunitinib hatásának megerősítése LDH és ECIS módszerekkel	53
7.7	A sunitinib az ADCC pán inhibitora	55
7.8	A sunitinib gátolja az NK sejtek aktivációját.....	57
7.9	A sunitinib módosítja a JIMT-1 sejtek fenotípusát és adhéziós képességét.....	60
7.10	A sunitinib kezelés csökkenti a sejtfelszíni HER-2 kifejeződését	61
7.11	A sunitinib gátolja a sejtciklust	63
7.12	A sunitinib autofágiát indukál a JIMT-1 sejtekben	64
7.13	A sunitinib ADCC rezisztenciát biztosít 3D szferoid modellben.....	66
7.14	A sunitinib nem indukált Akt foszforilációt a JIMT-1 sejtekben.....	68
8	Megbeszélés	69
9	Összefoglalás	75
10	Summary	76
11	Irodalomjegyzék	78
12	Tárgyszavak	91
13	Keywords.....	91
13	Köszönetnyilvánítás.....	92
14	Publikációs lista	94
15	Függelék.....	95

2 Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Magyar	Angol
(p)Akt	foszfo Akt / protein kináz B	phospho Akt / protein kinase B
ACT	adoptív sejttérápia	adoptive cell therapy
ADCC	antitest-függő sejtes citotoxicitás	antibody-dependent cellular cytotoxicity
AM	acetoximetil	acetoxymethyl
ANOVA	variancia analízis	analysis of variance
BCL-2	B-sejt limfóma 2 fehérje	B-cell lymphoma 2 protein
BSA	szarvasmarha szérum albumin	bovine serum albumin
C régió	konstans régió	constant region
CAR	kiméra antigén receptor	chimera antigen receptor
CD	differentiációs klaszter	cluster of differentiation
CDR	komplementaritást meghatározó régió	complementary-determining region
CEA	karcino-embrionális antigén	carcinoembryonic antigen
cSMAC	központi szupramolekuláris aktivátor klaszter	central supramolecular activator cluster
CTLA-4	citotoxikus T-limfocita antigén 4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CSC	rákos őssejt	cancer stem cell
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle Médium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil-szulfoxid	dimethyl sulfoxide
E : T	effektor sejt célsejt arány	effector to target cell ratio

Rövidítés	Magyar	Angol
ECD	extracelluláris domén	extracellular domain
ECIS	Elektromos sejt szubsztrát impedancia érzékelés	Electric-cell substrate impedance sensing
ECL	fokozott lumineszcencia	enhanced chemiluminescence
EGFP	fokozott zölden fluoreszkáló fehérje	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzim-kapcsolt immunoszorbens esszé	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epidermális-mezenhimális tranzíció	epidermal-mesenchymal transition
ER	ösztrogén receptor	estrogen receptor
ErbB	eritroblaszt onkogén	erythroblast oncogene
Fab régió	antigénkötő fragment régió	antigen binding regio
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtválogatás	fluorescence-activated cell sorting
FBS	magzati szarvasmarha szérum	fetal bovine serum
Fc régió	konstans régió	constant region
FDA	Élelmiszer-és Gyógyszerügyi Hivatal	Food and Drug Administration
Gz	granzim	granzyme
HCS	nagy áteresztőképességű szűrés	High-Content Screening
HER	humán epidermális receptor	human epidermal receptor
HRP	tormaperoxidáz	horseradish peroxidase
I érték	impedancia érték	impedance value
IDO	indolamin 2,3-dioxigenáz	indolamine 2,3-dioxygenase

Rövidítés	Magyar	Angol
IFN	interferon	interferon
IGF1R	inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor	insulin-like growth factor 1 receptor
IgG	immunglobulin G izotípus	immunoglobulin G isotype
IL-2	interleukin 2	interleukin-2
IS	immunológiai szinapszis	immunological synapse
IU	nemzetközi egység	international unit
LFA-1	limfocita funkció-asszociált antigén 1	lymphocyte function-associated antigene 1
M1	1-es típusú makrofág	type I macrophage
M2	2-es típusú makrofág	type II macrophage
MEM-NEAA	MEM Nem-Esszenciális Aminosav	MEM Non-Essential Amino Acid
MET	mezenhimális-epiteliális tranzíciós faktor	mesenchymal-epithelial transition factor
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex	major histocompatibility complex
MTOC	mikrotubus szervező központ	microtubule organizing center
mTOR	emlős rapamicin célpont	mammalian target of rapamycin
MUC1	mucin 1	mucin 1
NK sejt	természetes ölősejt	natural killer cell
NKG2D	természetes ölőcsoport 2 D tag	natural killer group 2 member D
PAGE	poliakrimamid gélelektroforézis	polyacrylamid gelelectrophoresis
PAM50	50 gén predikciós mikroarray elemzése	Prediction Analysis of Microarray 50
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat	pathogen-associated molecular pattern

Rövidítés	Magyar	Angol
PD-1	programozott sejthalál fehérje 1	programmed cell death protein 1
PIC	proteáz gátló koktél	protease inhibitor cocktail
PMSF	fenilmetilszulfonil fluorid	phenylmethylsulfonyl fluoride
PR	progeszteron receptor	progesteron receptor
PRR	mintázatfelismerő receptor	pattern recognition receptor
pSMAC	perifériás szupramolekuláris aktivátor klaszter	peripheral supramolecular activator cluster
PTB	foszfortirozin-kötő	phosphotyrosine binding
RANKL	nukleáris faktor kappa-B ligand receptor aktivátora	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RIPA puffer	radioimmunprecipitációs esszé puffer	radioimmunoprecipitation assay buffer
ROR1	receptor tirozin-kináz árvareceptor 1	receptor tyrosine kinase orphan receptor 1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát	sodium dodecyl sulphate
SH2	Src homológia-2	Src homology-2
SI	nemzetközi egység	system international
SRB	sulforodamin B	sulforhodamine B
STAT1	transzkripció jelátalakítója és aktivátora 1	signal transducer and activator of transcription 1
T/E	tripszin/EDTA	trypsin/EDTA
TBS	Tris-pufferelt sóoldat	Tris-buffered saline
TCA	trikarbonsav	trichloroacetic acid
TIL	tumort infiltráló lifocita	tumor infiltrating lymphocyte
TNF	tumor-nekrózis faktor	tumor necrosis factor

Rövidítés	Magyar	Angol
TRAIL	TNF-kapcsolt apoptózis-indukáló ligand	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	regulatórikus T sejt	regulatory T cell
V régió	varábilis régió	variable region
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor	vascular endothelial growth factor
α -MEM	alfa-módosított Eagle's minimum esszenciális médium	alpha modified Eagle's minimum essential medium

3 Bevezetés

A tüdőrák után az emlődaganatos kórkép szedi legtöbb áldozatát szerte a világon. Az elsősorban nőket érintő, korlátlan sejtosztódással járó megbetegedés számos típusát különböztetjük meg mind genetikai, mind fehérje expressziós profiljuk alapján. Az emlőtumor típusa nagymértékben befolyásolja a megfelelő terápia kiválasztását, ami lehet sugár-, kemo-, immunterápia vagy ezek kombinációja. A trastuzumab anti-HER2 humanizált monoklonális antitest, amelyet már a 2000-es évek előtt bevezettek a klinikai gyakorlatba a HER2+ emlődaganatok kezelésére. Tumorellenes hatását igen széles skálán fejt ki úgy, mint a HER2 receptor tirozin-kináz dimerizációjának gátlásával vagy az immunrendszer citotoxikus sejtjei által vezérelt antitest-függő sejt citotoxicitás (ADCC) által. Ilyen sejtölő hatású immunsejtek a természetes ölősejtek, másnéven az NK sejtek. A trastuzumab, mint egy híd úgy kapcsolja össze a HER2+ tumorsejtet az effektor sejtrel – annak CD16 receptorán keresztül – és így teszi lehetővé, hogy kialakuljon az immunológiai szinapszis. Az immunsejt pedig ebbe a térbe üríti perforin-és granzim-tartalmú granulumait irányított exocitózissal és indukálja a tumorsejt apoptózisát.

A nagy áteresztő képességű vizsgálatok alkalmával lehetőség nyílik szimultán több száz, ezer vagy millió vegyület tesztelésére egy jól beállított *in vitro* rendszerben. Az úgynevezett drug repurposing a könyvtárszűrések azon fajtája, amikor kereskedelmi forgalomban lévő hatóanyagoknak keresünk új, eddig nem ismert terápiás hatását.

A HER2 receptort célzó trastuzumab terápia csupán az esetek csekély százalékában vált ki kedvező hatást az anti-HER2 ellenanyag ellen kialakuló rezisztencia következtében. Azonban az ADCC-t indukáló funkciója eredményes. Éppen ezért a disszertációm fő témája a klinikai gyakorlatban rendszeresen alkalmazott trastuzumab által közvetített ADCC reakciót fokozó gyógyszerhatóanyagok azonosítása drug repurposing segítségével.

4 Irodalmi áttekintés

4.1 Onkológiai alapfogalmak

„Az egész nagyobb, mint a részek összessége.”

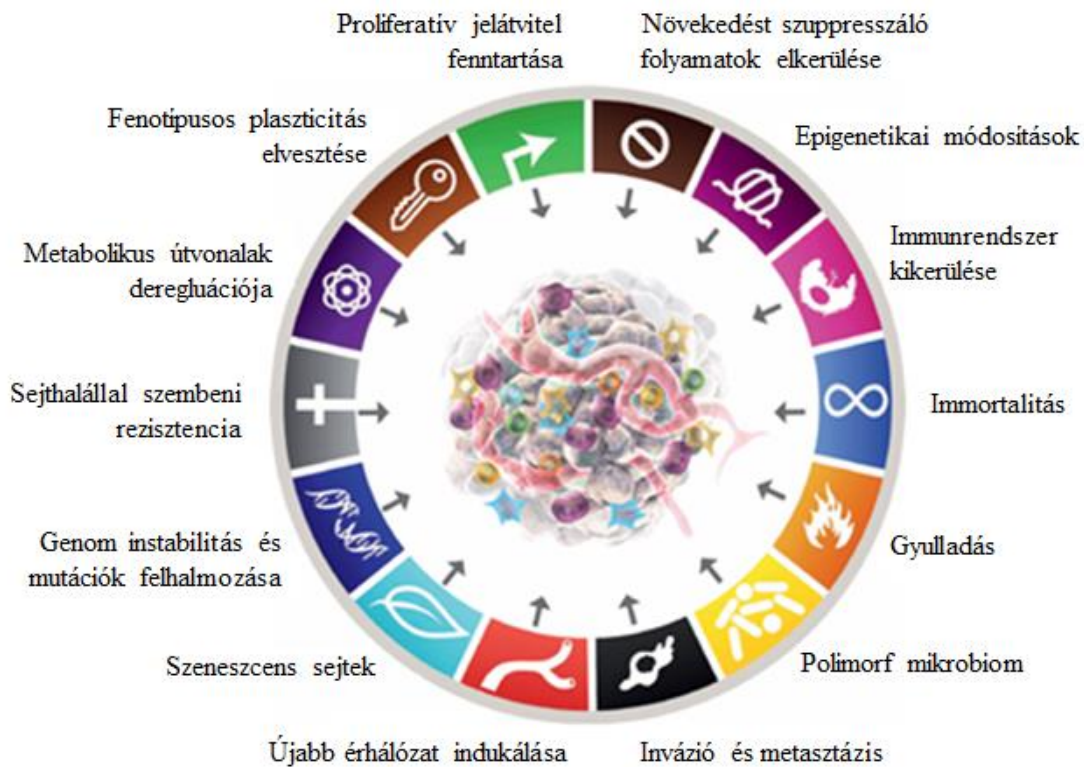
Arisztotelész (i.e. 384 - 322)

Az ókori görög filozófus híres idézete az onkológia területén is megállja a helyét, amely szó a görög *oncos* (tömeg, tumor) és *logosz* (tan) szavak összeolvadásából ered ^{1,2,3,4}. Bár Arisztotelész még nem találkozhatott a tumorigenezis fogalmával, ma már tudjuk, hogy a tumoros transzformációt az intra-és extracelluláris folyamatok többszintű meghibásodása eredményezi. Az én olvasatomban ezt a mondatot úgy értelmezhetjük, hogy az elméleti és a klinikai orvostudomány szakembereinek együttműködése elengedhetetlen egy-egy sikeres terápiás eljárás kidolgozásához. Bár a molekuláris mechanizmusról egyre többet tudunk, de még a mai napig is vannak megválaszolatlan kérdések, azaz vannak olyan *részek*, amelyek még mindig hiányoznak az *egész* megértéséhez.

A rák kialakulása többlépcsős folyamat, amely a normál egészséges sejtek átalakulásához (transzformáció) vezet. A gének legalább három csoportja játszik fontos szerepet a tumor iniciációban, ezek a proto-onkogének, a tumorsuppresszor gének és a DNS hibajavító mechanizmusait irányító gének. Ezen genetikai elemeket érintő mutációk, amplifikációk vagy deléciók eredményezik a tumorsejtre jellemző szabályozatlan sejtnövekedést és differenciációt ⁵. A karcinogének vagy iniciátorok olyan faktorok, amelyek ezeket a folyamatokat elindítva vezetnek a rákos kórkép patogeneziséhez, ezt nevezzük karcinogenezisnek ^{6,7}. A karcinogenezis lényegében még csupán egy sejtet érint, amely mutációkat felhalmozva rákos őssejtté (cancer stem cell, CSC) válik. A CSC hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a normál őssejt, azaz képes szimmetrikus – önmegújító –, illetve aszimmetrikus – differenciációs – osztódásra egyaránt ^{8,5}. A CSC folyamatos proliferációjával viszont már a tumorigenezis folyamatát produkálja, ami már kontrollálatlanul proliferáló sejtek halmazát foglalja magában ⁹. Megkülönböztetünk jó- és rosszindulatú daganatokat a proliferációs és inváziós képességük alapján. A benignus vagyis a jóindulatú tumorokra jellemző a relatíve lassan osztódó sejtömeg, amely fizikailag jól körülhatárolható és a környező vagy távoli szövetekre nem áttérjedő. Ezzel szemben a malignus, azaz rosszindulatú rákos megbetegedés esetén nagyon gyors proliferáció és a sejtek testszerte való megjelenése jellemző ¹⁰.

4.2 A tumorigenezist előidéző molekuláris elváltozások

Egy 2016-ban megjelent tanulmány szerint a daganatos megbetegedések már közel 2 millió éve sújtják az emberiséget. Az első írásos feljegyzés 1775-ben jelent meg, amely összefüggést ír le a kéményseprők korommal való kitettsége és a herezacskó rák megjelenése között ¹¹.



1. ábra A tumorsejtek általános jellemzői

A rák olyan megbetegedés, amely testszerte bárhol felbukkanhat és ebből adódóan egy igen heterogén kórképről beszélhetünk. A szöveti környezettől függetlenül azonban a daganatos szövetet felépítő rákos sejtek olyan molekuláris (pl. mutációk), fenotípusos (pl. fenotípusos plaszticitás: EMT) és funkcionális (pl. metabolizmus megváltozása) elváltozásokat mutatnak, amely tulajdonságok kruciálisak az egészséges sejtek tumoros sejtekké történő transzformációjához¹².

A tumorsejtek általános jellemzőit az **1. ábra** szemlélteti. 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 ^{12,13}.

A fenotípusos plaszticitás értelmében a sejt tulajdonságai megváltoztatásával adaptálódik a folyamatosan változó környezeti feltételekhez ¹⁴. A tumoros sejtek azonban képesek kikapcsolni ezen funkciójukat és teljesen önállóvá, függetlenné válni a környezetüktől. Ismert, hogy a daganatos sejtek egészséges, differenciálódott sejtek visszadifferenciálódásával progenitor-szerű állapotba kerülnek, így hozva létre a daganatos őssejteket (CSC). Az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) a sejtek fenotípusának epiteliálisból mesenchymális típusúvá történő megváltozását jelenti. Az EMT jellegzetességeit mutató CSC-k esetében nagymértékű gyógyszerrezisztencia figyelhető meg. A daganatos őssejtek ugyanis a sejtmembránjukon olyan transzportereket fejeznek ki, amelyek a rákellenes gyógyszereket az intracelluláris térből az extracelluláris közegbe szállítják ^{12,15}.

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 ^{12,16}.

Kimutatták, hogy az apoptózis intrinzik útvonala is gyakran megszakad a rákos sejtekben. Az apoptózis elkerülését a halálreceptorok jelátvitel defektusa, a pro-és anti-apoptotikus fehérjék egyensúlyának felborulása, illetve a csökkent kaspáz aktivitás jellemzi ¹⁷.

Az olyan DNS mutációkat, amelyek szelektív növekedési előnyt biztosítanak egy-egy sejt számára „driver” mutációknak nevezzük ¹⁸. Ugyanakkor a „passanger” mutációk nem fokozzák a sejt proliferációs képességét, de megtalálhatóak a rákos sejt genomjában ¹⁹. A protoonkogének funkciónyerékes mutációja stimulálja a sejtnövekedési, osztódási, valamint túlélési folyamatokat, míg a tumorsuppresszor gének funkcióvesztékes mutációja szabályozza a DNS hibajavítási, valamint sejtciklus ellenőrzési folyamatokat ²⁰. 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 ^{21,20}. Továbbá a nem-kódoló mikroRNS-ek is hatással vannak a tumorigenezis folyamatára, ugyanis onkogénként is viselkedhetnek ^{20,22}.

Az angiogenezis az új vér- és nyirokerek kialakulását jelenti egy már meglévő érrendszerből, ezáltal lehetővé téve a daganatsejtek számára a tápanyagok és oxigén utánpótlását, illetve anyagcsere termékeik elszállítását ²³.

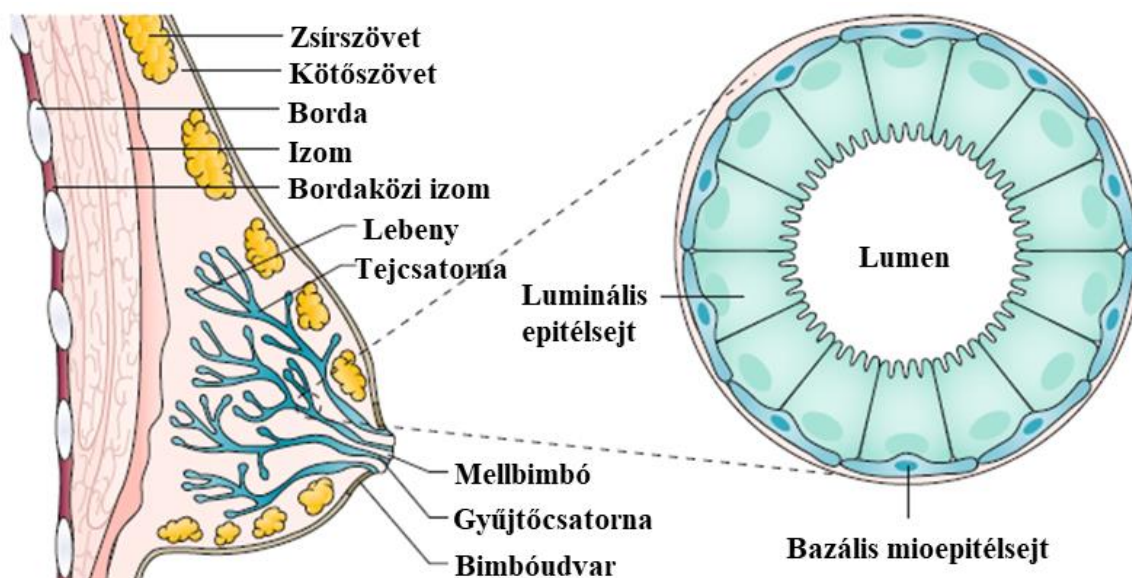
A béltraktusban élő mikróbák esszenciális élettani folyamatokban vesznek részt (immunrendszer fejlődése, vitaminszintézis, tápanyagfelvétel), azonban a mikrobiom összetételének és diverzitásának megváltozása – diszbiózis – hozzájárulhat a daganatos kórkép patogeneziséhez ²⁴. A bélrendszeri mikróbák által szekretált bioaktív metabolitok (reaktívált ösztrogén, rövid láncú zsírsavak, aminosav metabolitok, másodlagos epesavak) befolyásoló hatással vannak a mitokondriális anyagcsere folyamatokra, amelyek hozzájárulhatnak például az emlő tumorigenezis folyamatához ²⁵.

A daganatok progressziójának egyik legfőbb akadálya az immunrendszer legyőzése, azonban a transzformálódott sejtek képesek a gazdaszervezet védekező rendszerét maguk mellé állítani, amely az immunoediting jelenségeként vált ismertté. Három fázisát különböztetjük meg, amelyek egymást meghatározott sorrendben követve az alábbiak: elimináció, egyensúly, menekülés ^{26,27}. Az elimináció alatt a transzformált sejtek egy részét az immunrendszer sikeresen legyőzi, azonban amelyek ezt a fázist kikerülik, belépnek az egyensúlyi szakaszba. Ekkor a rákos sejtek egy funkcionális dormancia állapotba kerülnek, amikor is csendes megfigyelőként megtanulnak az immunrendszer támadó mechanizmusai ellen védekezni (pl. antigénvesztés, immunszuppressziót kiváltó fehérjék kifejezése). A menekülési fázisban pedig már az immunológiailag átforgatott tumorsejtek fokozatosan növekedni kezdenek immunszuppresszív tumormikrokörnyezetükben ²⁷. Kiemelendő például a gyulladásos makrofágok – M1-szerű – a tumor mikrokörnyezeti stimulusok hatására anti-inflammatorikus makrofágokká – M2-szerű – polarizálódnak. Az M2 sejtek ugyanis hozzájárulnak az angiogenezis, az EMT folyamataihoz, továbbá immunszuppresszív mechanizmusokat kapcsolnak be ²⁸.

4.3 Emlőtumorokról általánosságban

Az emlő zsírszövet állományában gazdag csatornahálózat figyelhető meg, amelyet a luminális és a bazális mioepitélsejtek közel 1:1 arányban alkotnak. A tejcsatorna külső rétegében elhelyezkedő hosszúkás mioepitélsejtek kontraktilis tulajdonságuk révén a laktációs időszak alatt a tejürítésben kapnak fontos szerepet, ugyanakkor a bazális membrán termelő képességüknél fogva egyfajta természetes tumorszuppresszor funkcióval is rendelkeznek.

Ezáltal elválasztják az emlő kötőszöveti állományától a proliferáló epitélisejteket, így megakadályozva azok invázióját nem természetes közegükbe ^{29,30} (2. ábra).



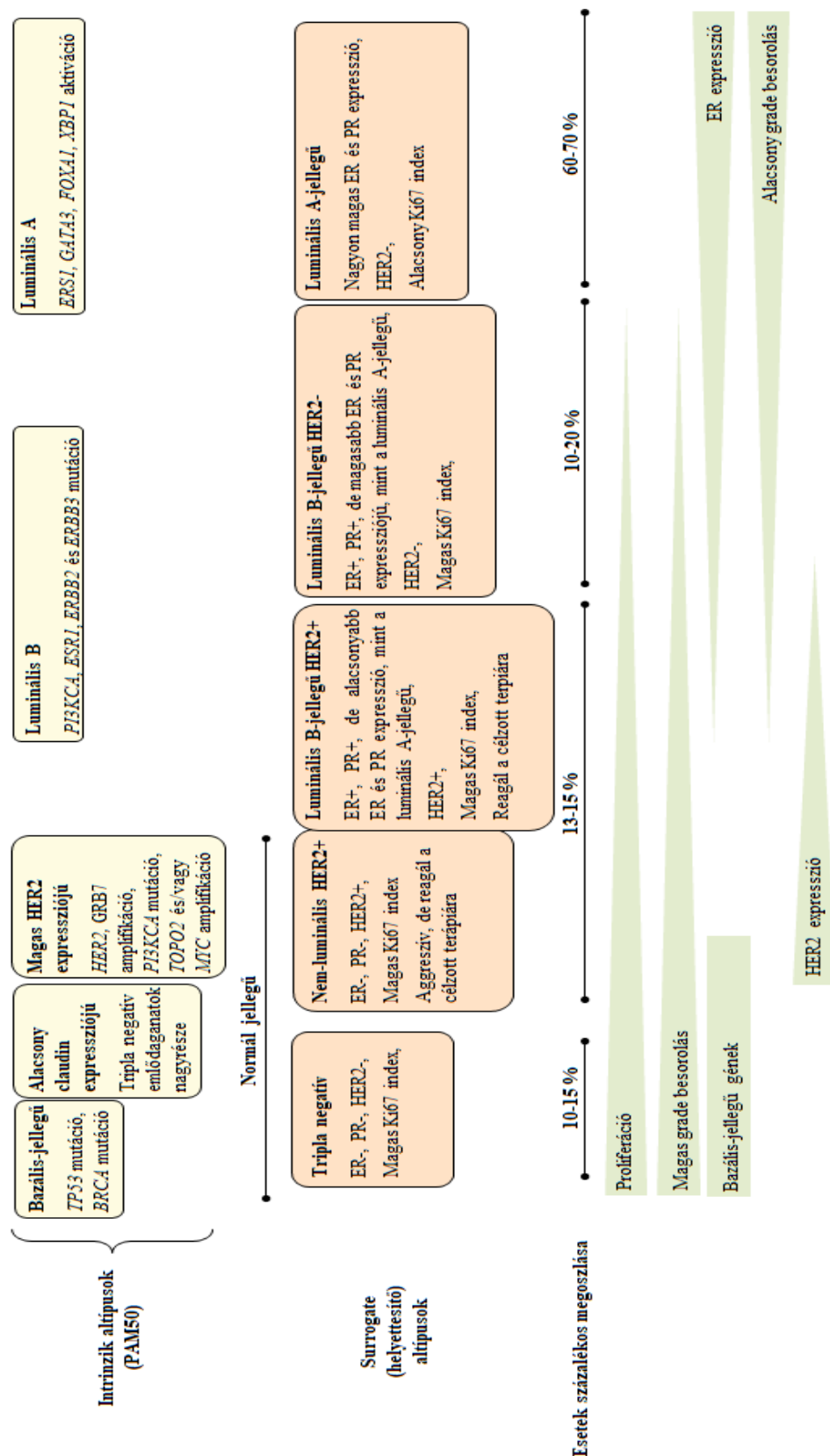
2. ábra A női emlő anatómiája

Az emlő mindkét nemben megtalálható szerv, amely a férfiaknál a bimbódudvarra korlátozódik és nem termel tejet. A női emlő azonban, mint másodlagos nemi jelleg a pubertás során kezd maturálódni és terhesség esetén a tejtermelődés helyszíne. Ebből kifolyólag fibroglanduláris állományban gazdag zsír- és kötőszövetből álló szerv ^{31,32}.

Az emlőrák a tüdődaganat után a leggyakoribb rákos megbetegedés, míg a nők körében a legelterjedtebb ³³. A korai stádiumú, áttétet nem mutató betegek 70-80%-a gyógyítható. A dolgozat ezen mondatának forrásául szolgáló Nature cikk a korai emlőrákot a következőképpen definiálja: „A korai emlőrák a mellre vagy csak a hónalji nyirokcsomókra terjed”. Ezen megfogalmazás szintén így szerepel a „National Breast Cancer Foundation” (<https://nbcf.org.au>) honlapján is, amely azzal az információval is ki van egészítve, hogy ide sorolandó az 1-es és 2-es stádium. Az 1-es stádium azt jelenti, hogy a tumor mérete 2 cm-nél kisebb, míg a 2-es stádium esetén a tumor mérete meghaladhatja a 2 cm-t és már távolabbi helyeken is kimutathatóak a rákos sejtek. A 2A stádiumra jellemző, hogy 2 cm alatti a tumor mérete, de 1-3 nyirokcsomóban már kimutatható vagy 2-5 cm-es, de nincs jelen nyirokcsomóban. A 2B stádiumban pedig 2-5 cm-es tumor van 1-3 nyirokcsomón belül vagy 5 cm-nél nagyobb kiterjedésű, de nyirokcsomót nem érint. Az 5 éves túlélési ráta korai emlőrák esetén 90 % körüli értéket mutat. A mellrák heterogén kórképnek minősül mind molekuláris szinten, mind terápiára adott válaszreakciója alapján ^{31,34}. 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 emlőtumorokat ^{31,34}. Azonban fehérje szintű, immunhisztokémiai csoportosítás alapján beszélhetünk az úgynevezett helyettesítő – surrogate – osztályozásról ^{31,35}.

A HER2-pozitív emlőtumorokon belül megkülönböztetünk nem-luminális (“HER2-enriched”) és luminális alcsoportokat. A luminális HER2⁺ dagatokra jellemző az ösztrogén-és progeszteron receptor pozitivitás és 15-30%-os Ki-67 index, míg a nem-luminális típus jellemzően ösztrogén-és progeszteron receptor negatív fenotípust mutatnak és > 30 %-os Ki-67 index-szel rendelkeznek. A HER2-enriched rosszabb prognózist eredményez összehasonlítva a a luminális típussal ³⁶. Az egyes emlőtumor csoportokra jellemző tulajdonságokat a **3. ábra** foglalja össze.



3. ábra Az emlőtumорок osztályozása

Az emlőtumорок csoportosítása a tumorsuppresszor, protoonkogén, hormonreceptor és növekedési faktor receptorok alapján ³¹.

Az **1. táblázat** a teljesség igénye nélkül listázza azon protoonkogéneket és tumorszuppresszor géneket, amelyek az emlődaganatos kórképpel kapcsolatba hozhatók.

PROTOONKOGÉNEK		TUMORSZUPPRESSZOR GÉNEK	
Gén	Fehérjetermék	Gén	Fehérjetermék
<i>CCDN1</i>	ciklin D1	<i>ATM</i>	ATM: DNS hibajavítás
<i>ERBB2</i>	HER2 RTK	<i>BRCA1</i>	BRCA1, 2: DNS hibajavítás
<i>FGFR1</i>	FGF növekedési faktor receptora	<i>BRCA2</i>	
<i>GATA3</i>	emlőmirigy fejlődését szabályozó transzkripciós faktor	<i>CDH1</i>	E-cadherin: adhézio
<i>MYC</i>	MYC transzkripciós faktor	<i>CHEK2</i>	CHECK2: DNS hibajavítás, sejtciklus, apoptózis
<i>PIK3C</i>	PI3K enzim katalitikus alegysége	<i>NF1</i>	NF1: ER- α transzkripciós ko-represszor
		<i>PALB2 (FANCN)</i>	PALB2 (FANCN): DNS hibajavítás BRCA2-vel
		<i>PTEN</i>	PTEN: PI3K-Akt atonal negatív regulátora
		<i>STK11</i>	STK11: AMPK-t foszforiláló kináz
		<i>TP53</i>	p53: DNS hibajavítás, sejtciklus, kromatin remodelling, apoptózis

1.táblázat Az emlődaganatok leggyakoribb funkciónyeréses protoonkogénjei és funkcióvesztéses tumorszuppresszor génjei

A protoonkogének a sejtnövekedési, osztódási, illetve túlélési folyamatokat, míg a tumorszuppresszor gének a DNS hibajavítási, valamint a sejtciklus ellenőrzési folyamatokért felelős fehérjéket kódoló mRNS szekvenciákat hordozzák (Hanahan et al, 2022).

4.4 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 ³¹. Az emlődaganatok diagnózisának időpontjában az esetek több, mint 90 %-ában nem tapasztalható metasztázis, ami igen kedvező prognózissal társul ³⁷. 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 ³¹. Az úgynevezett neoadjuváns terápiáról először 1957-ben olvashattak a szakemberek, amelyet

eredetileg a nem metasztatikus és nem operálható emlőrák kezelésére fejlesztettek ki. Ma már preoperatív kezelésként tartjuk számon, ugyanis alkalmazásával csökkenthető a tumor mérete. 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 ³⁸.

4.4.1 Sugár-és kemoterápia

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 besugárzás helyén, azaz lokális és nem szisztémás hatást fejt ki ³⁹. A nem-célzott kemoterápiás gyógyszerhatóanyagok jelentik a rák kezelésének egyik módját. Számos Mechanizmus révén képesek kifejteni hatásukat. A taxánok (pl. paclitaxel) a citoszkeletális rendszerre hatnak, a topoizomeráz inhibitorok (pl. antraciklinek) a replikáció során DNS-ben keletkező mechanikai feszültség megszüntetése nélkül eredményeznek DNS törtést. Az alkiláló ágensek (pl. doxorubicin) DNS interkalációval okoznak szimpla-vagy duplaszálú DNS törést. Az antimetabolitok (pl. 5-fluorouracil) a DNS szintézis gátlására gyakorolnak hatást ⁴⁰.

A másik csoport képviselői közé sorolandó a célzott terápiás eljárások, amelyek kiválasztásának alappillére a tumor molekuláris jellemzőin alapszik, sőt attól is függ, hogy korai vagy előrehaladott emlődaganatról van-e szó ^{31,38}. A hormonszenzitív daganatok esetén a páciens endokrin terápiában részesül. Az aromatáz inhibitor (letrozole, anastrozole, exemestane) blokkolja az ösztrogén hormon szintézisét. A szelektív ösztrogén receptor modulátorok (tamoxifen, raloxifene) kompetitív inhibitora az ösztrogén ligandumnak, így megakadályozza annak magreceptorához történő kötődését. A szelektív ösztrogén receptor blokkolók (fulvestrant) az ösztrogén receptor degradálásán keresztül csökkenti annak koncentrációját a sejtben ⁴¹. Klinikai használatban van az a heterobifunkcionális molekula is, amely két ligandumot hordoz, amelyek közül az egyik az ösztrogén receptorhoz, míg másik az E3 ubikvitin ligáz enzimhez tartozik, ezáltal egymáshoz kapcsolja a receptort és az enzimet, majd a receptor poliubikvitinációja elindítja annak proteaszómális degradációját. A fent említett mechanizmus mindegyének eredménye az ösztrogén által kiváltott celluláris események blokkolása ⁴².

4.4.2 Immunterápia

4.4.2.1 *Monoklonális antitestek*

Az antitestet másnéven ellenanyagnak vagy immunglobulinnak nevezzük, amely a plazmasejt durva felszínű endoplazmatikus retikulumán lévő poliszómákon szintetizálódik ⁴³. Az immunglobulinok heterodimer fehérjék, amelyek két nehéz és két könnyű láncból épülnek fel. Funkcionálisan megkülönböztetünk variábilis (V) és konstans (C) doméneket. A V régió rendelkezik antigénkötő képességgel, míg a C régió határozza meg az antitest által kiváltott effektor funkciót (komplement aktiváció, Fc receptorhoz kötődés). A könnyű és nehéz lánc V doménje egyaránt három-három komplementaritásért felelős régiót (complementarity determining region, CDR) foglal magában és együttesen alakít ki antigén kötőhelyet ⁴⁴. Az antigén olyan molekula, amely a gazdaszervezet immunrendszerét aktiválja ⁴⁵. A CDR az antigén csupán egy kis részét, az úgynevezett antigén determinánst, azaz az epitópot ismeri fel és kötődik ahhoz ⁴⁶. A rákellenes terápiák egyik eszköze a monoklonális antitestek alkalmazása. A monoklonális immunglobulinok olyan ellenanyagok összessége, amelyek ugyanazt az egyetlen epitópot ismerik fel az antigénen ^{47,48}. A monoklonális antitestek különféle technológiával állíthatók elő (pl. hibridóma technikával). 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 ³³. 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 ³³. 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 kevesebb, mint 35 %-ánál vált ki megfelelő terápiát. Ezek a betegek korábban nem találkoztak trastuzumabbal, azaz primer („öröklött”) ellenálló képességről beszélhetünk. Másrészt azon páciensek, akik korábban már kaptak trastuzumab kezelést, az esetek ~70%-ában tapasztalható rezisztencia. Ebben az esetben másodlagos (szerzett) ellenállásként definiálhatjuk ⁴⁸. Ezen adatokból világossá válik, hogy a trastuzumab-közvetített terápiás eljárás módosítására/fokozására van szükség ADCC-függő módon, amelynek indukálására kiválóan alkalmas a trastuzumab. A trastuzumab rezisztencia hátterében álló mechanizmusokat a **2. táblázat** foglalja össze.

Mechanizmus	Molekuláris résztvevő	Hatás
Blokkolt trastuzumab kötődés	p95HER2	extracelluláris domén (trastuzumab kötőhely) nélküli, kináz aktivitással rendelkező HER2 receptor „maradék”
	Mucin 4	epitóp maszkírozás
	CD44/hialuronsav komplex	epitóp elfedés
Fokozott HER2 jelátvitel	PTEN	funkcióvesztéssel mutációjával nincs proliferációs gátló szignál
	PI3K	intenzív proliferáció
	Akt és PDK1 elváltozások	intenzív proliferáció
Jelátvitel alternatív receptor útvonalon	IGF1R	transzmembrán tirozin-kináz receptor, amely foszforilálja a HER2-t
	p27	alacsony expressziós szintje fokozott Cdk2 aktivációt és proliferációt eredményez
	EGFR (HER1) és HER3	HER2 helyett egymással alkotva heterodimert indul be a jelátvitel
	c-Met	Akt aktiváció
	CXCR, $\alpha 6\beta 1$ és $\alpha 6\beta 4$	integrin jelátvitel
Nem hatékony immunrendszer aktiváció	Fc receptor	effektor immunsejtek Fc γ RIII 158V/F polimorfizmus csökkent ADCC indukció

2. táblázat Trastuzumab rezisztenciát eredményező mechanizmusok

A trastuzumab terápia sikeressége több mechanizmus révén is meghiúsulhat. A tumoros sejt eliminálása blokkolódhat a trastuzumab kötődésének hiányában, a fokozott HER2 jelátvitel vagy alternatív szignál transzdukciós útvonal aktivációján keresztül. Ugyanakkor az immunrendszer aktivációban fellépő zavar szintén a terápia sikertelenségét eredményezi ⁴⁹.

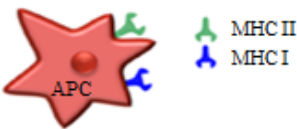
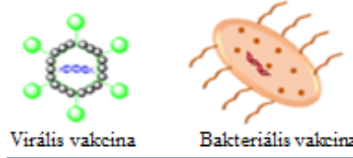
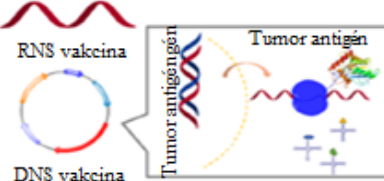
4.4.2.2 Bispecifikus antitestek

A bispecifikus antitestek szemben a konvencionális ellenanyagokkal két eltérő antigén-kötőhellyel rendelkezik egy azon molekulán belül ^{33,50}. Az első generációs bispecifikus ellenanyag molekulák előállítása igen komoly limitációja, hogy kis mennyiségű terméket eredményezett. A rekombináns technikával történő előállítás azonban kiküszöbölte a korábbi problémát. Alkalmasak ADCC indukciójára, miáltal az antitest egyik Fab régiója a tumorsejt sejtfelszíni receptorához, míg másik Fab régiója az effektor sejtet ismeri fel és hídként

funkciónál 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 ^{33,50}. 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 sejt felszíni protein ⁵¹.

4.4.2.3 Rák elleni vakcinák

Számos tanulmány vizsgálja a dendritikus sejt, egész tumorsejt lizátum, RNS/DNS és peptid célpontú neoantigén vakcinák hatékonyságát és biztonságosságát a tumorterápiában. Azonban komoly kihívást jelent a megfelelő antigén kiválasztása ³³. Az immunrendszer működésének része a „saját” és „nem-saját” motívumok közötti diszkrimináció. A tumor-asszociált antigének olyan tumorantigének, amelyek a normál, egészséges sejt felszínén is megjelennek, de jóval alacsonyabb mennyiségben. Ebből világosan látszik, hogy az immunrendszer nem fogja megtámadni a tumoros sejtet, hiszen „saját” motívumként azonosítja. Azonban a neoantigének 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 ⁵². A rák ellenes vakcinák előnyeit és hátrányait a **3. táblázat** foglalja össze.

Sejt-alapú vakcina 		Előny: – Magas immunogenitás – Kontrollált antigén prezentáció	Hátrány: – Drága és bonyolult előállítás
Protein/peptid-alapú vakcina 		Előny: – Alacsony toxicitás – Egyszerű előállítás	Hátrány: – Alacsony/mérsékelt immunogenitás – Peptid vakcina: HLA altípus-függő – Protein vakcina: drága előállítás
Virális/bakteriális-alapú vakcina 		Előny: – Magas immunogenitás – Könnyen előállítható nagy mennyiségben	Hátrány: – Potenciálisan magas toxicitás – Fertőzés kialakulásának veszélye – Vektor elleni immunválasz
Gén-alapú vakcina 		Előny: – Többféle antigén egyszerű szállítása – Celluláris és humorális immunválasz indukciója – Nem HLA-specifikus	Hátrány: – RNS vakcina: specifikus transzport/tárolás – DNS és RNS vakcina: gyenge immunogénitás humán szervezetben

3. táblázat A rák ellenes vakcinák előnyei és hátrányai

A rákos sejtek az immunoediting mechanizmusa révén könnyedén elkerülik az immunrendszer védekező reakcióit. Ezáltal világossá vált, hogy a szervezet tumorelimináló képességét terápiás úton erősíteni kell, ezért bevezették a rák ellenes vakcinák alkalmazását. Lényege, hogy olyan antigént juttatnak a szervezetbe, amelyek az egészséges sejteken nem, míg a tumoros sejtek felszínén expresszálódik – ezeket neoantigéneknek nevezzük – és így láthatóvá válnak az immunrendszer számára és eltávolíthatja azokat ⁵³.

4.4.2.4 Adoptív sejtherápia

Az adoptív sejtherápia (adoptive cell therapy, ACT) szekvenciális lépések sorozata, amelynek célja a rákkal diagnosztizált páciens anti-tumor immunválasz reakcióinak aktiválása. Az ACT során a betegből tumor-specifikus T-limfocitákat, természetes ölősejteket (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 sejtölés ^{33,54}. A tumor-infiltráló limfociták (TIL) fontos indikátorai a tumor immunogenitásának, ugyanis információt szolgáltatnak a várható prognózisról, a kemoterápia hatékonyságáról, illetve

segítséget nyújtanak a megfelelő immunterápia kiválasztásában ³³. Ismert, hogy a tumor mikrokörnyezetében a TIL-ken kívül M1-típusú makrofágok, dendritikus sejtek jelenléte is kifejezetten előnyös. Ezek az immunsejtek hozzájárulnak az ACT sikerességéhez, továbbá a kimerült TIL-k szerepét is átvehetik, amennyiben a páciens immun ellenőrzési pontot gátló antitest (pl. anti-PD-1) kezelésben is részesül. Az ACT specificitásának eszköze olyan autológ T-sejtek visszajuttatása a szervezetbe, amelyek T-sejt receptorai CRISPR/Cas9 technikával genetikai módosításon estek át ³³. 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 ⁵⁵. 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 ³³.

4.4.2.5 Kombinált immunterápia

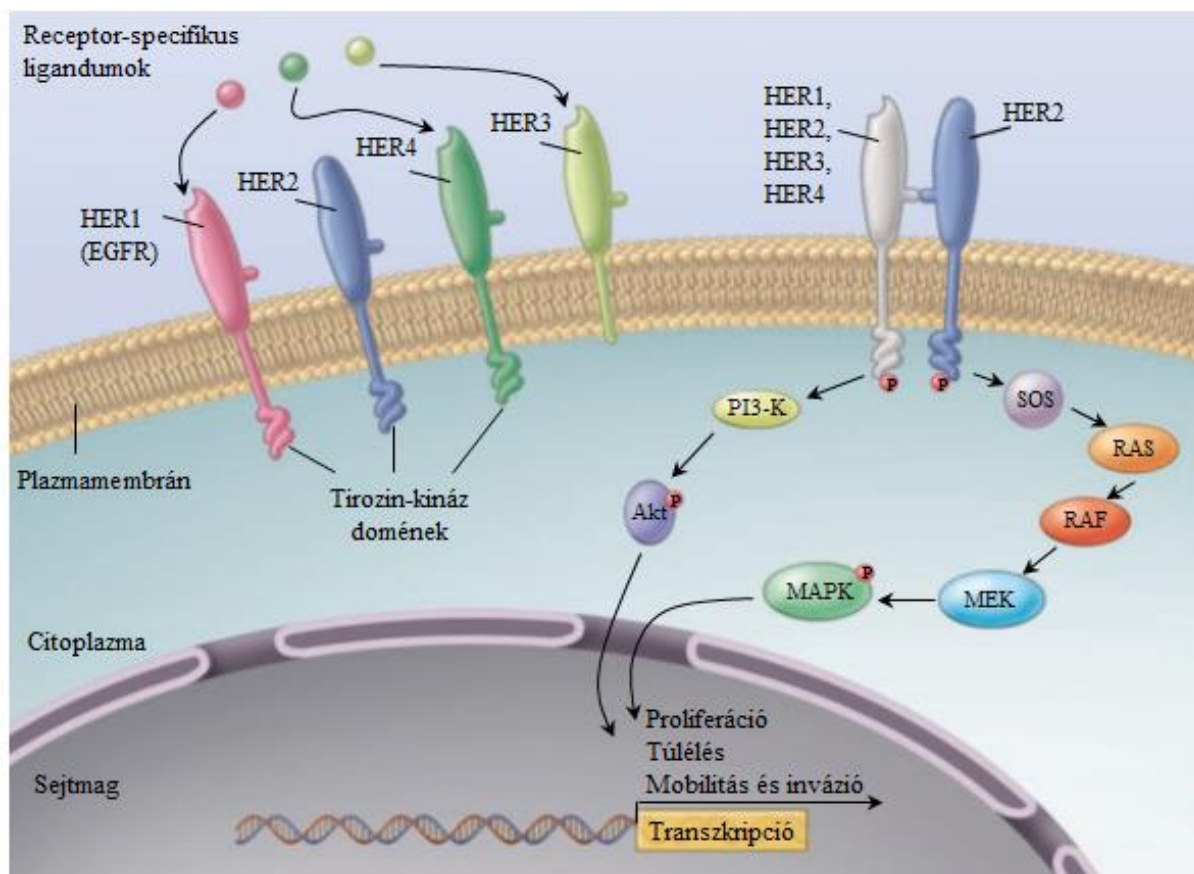
Az immunterápiára nem reagáló páciensek esetén terápia kombinációkat alkalmaznak. Például a trastuzumab (anti-HER2 monokonális antitest) ADCC indukciójára kiválóan alkalmas HER2+ emlőtumorban szenvedőknél. A HER2+ emlőtumoros sejtek felszínén PD-L1 fehérjék is expresszálódnak, amelyet anti-PD-L1 és trastuzumab monoklonális antitestek együttes adminisztrációjával kezelnek. A CTLA-4 a regulatórikus T sejteken (Treg) megjelenő a CD4+ és CD8+ T-limfociták számára tolerogén választ kiváltó fehérje. A CTLA-4 inhibitorok CAR T-sejtek vagy anti-PD-1 antitestek kombinált alkalmazása is tesztelési fázisban van. Az indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) olyan enzim, amely az effektor T limfociták anergiáját eredményezi, éppen ezért gátlása javítja a prognózist. Kombinációban szintén alkalmazható anti-PD-1 antitesttel ³³.

4.4.3 Trastuzumab hatásmechanizmusa

4.4.3.1 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 **(4. ábra)**. Valamennyi receptor tartalmaz egy ligandumot (növekedési faktor)

kötő extracelluláris domént (ECD), egy transzmembrán lipofil szegmenst és egy intracelluláris tirozin-kináz domént (kivéve a HER3) ^{56,57}. 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 ⁵⁷. Ez a folyamat teszi lehetővé a tirozin oldalláncok *transz*-autofoszforylációját, ezzel dokkoló felszínt biztosítva a downstream jelátvitel során következő elemeinek, amelyek Src homológia-2 (SH2) vagy foszfortirozin-kötő (PTB) doménnel rendelkeznek ^{58,59,57}.



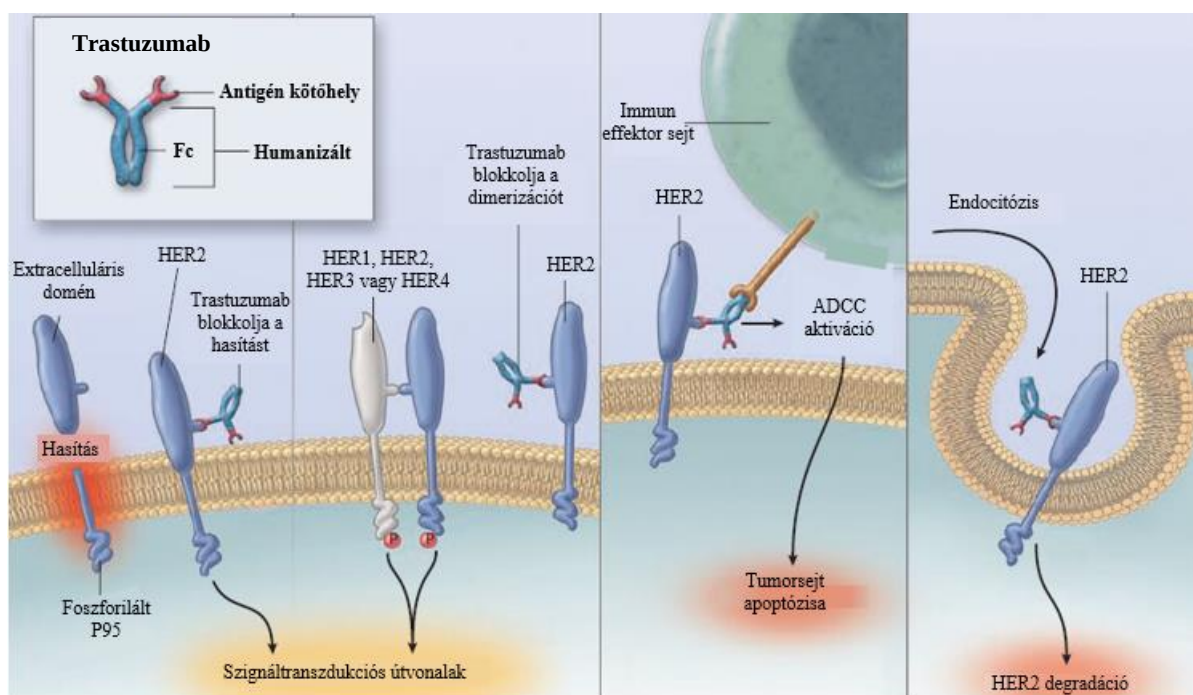
4. ábra A humán epidermális növekedési faktor jelátviteli útvonal sematikus ábrázolása

A család valamennyi tagja azonos struktúrával rendelkezik, kivéve a HER3-t, ugyanis hiányzik az intracelluláris tirozin-kináz doménje. A HER2 kivételével a család minden tagjának van ismert liganduma, ennek ellenére mégis a leggyakoribb heterodimerizációs partner a kiemelkedően magas katalitikus aktivitása miatt. Ezen túlmenően a HER2 extracelluláris doménje konformációjából adódóan, ligandum nélküli állapotában is képes jelátviteli útvonalat aktiválni. Ezért, ha a HER2 sejtfelszíni expressziója megemelkedik, a HER család bármelyik tagjával heterodimert alkotva növekedési faktor jelenléte nélkül is elindulnak az osztódási, túlélési mechanizmusok. A HER jelátvitel a Ras-mitogén-aktivált protein-kináz útvonalon keresztül közvetíti a sejtprolifерációt, míg a sejthalált a foszfatidil-inozitol 3'-kináz-AKT-mTOR útvonalon gátolja ^{56,57}.

4.4.3.2 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 ⁶⁰. A túlzott HER2 expresszió hátterében a gén amplifikációja vagy overexpresszió állhat, amelynek százalékos előfordulása a **3. ábrán** látható ³¹. A HER2-pozitív emlődaganatokban a ERBB2 gén akár 25-50 kópiában is jelen lehet, így 40-szer 100-szor több HER2 fehérjetermék keletkezik. A HER2-pozitív emlőtumor a második legagresszívebb típus a triplanegatív csoport

után. Az adott emlőtípusra jellemző molekuláris tulajdonságok szabják az adott terápiára típusát^{61,62}. A HER2-pozitív emlőtumor kezelésére alkalmazandó a trastuzumab, anti-HER2 ellenanyag. 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^{63,56,64}. A membrán-kötött csonka receptor konstitutív aktivációja folyamatosan bekapcsolva tartja a jelátvitelt⁶⁴. 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 által közvetített ADCC reakció indukálására^{63,56} (**5. ábra**).

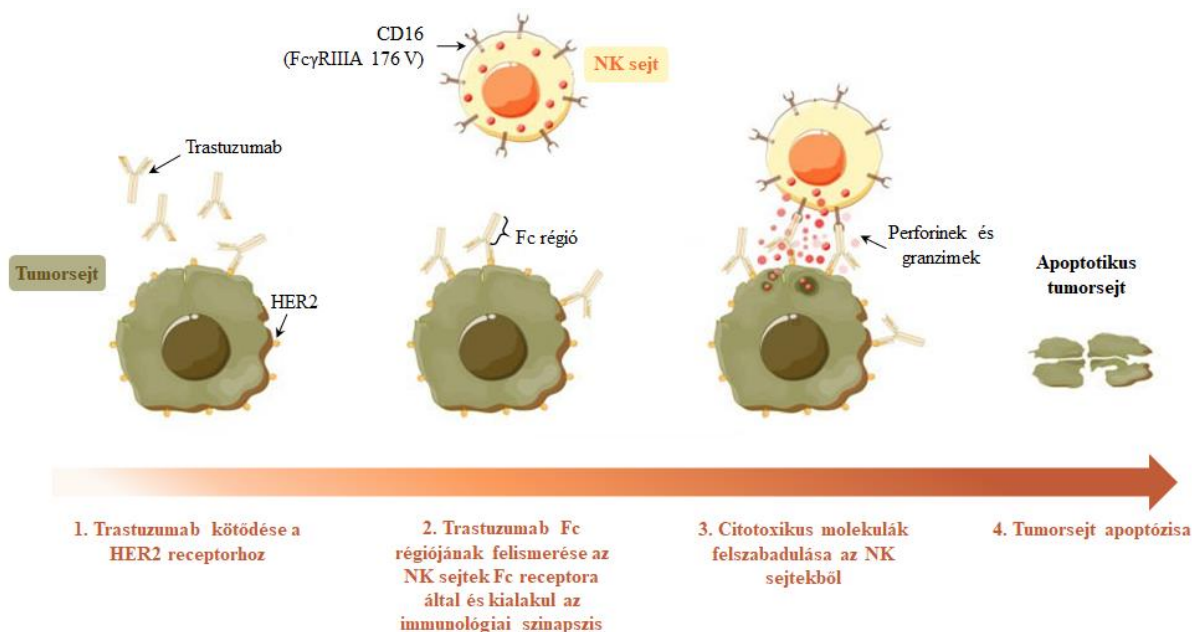


5. ábra A trastuzumab hatásmechanizmusai

A trastuzumab humanizált Fc régiója biztosítja, hogy az immunrendszer ne támadja meg az idegen anti-HER2 antitestet. Míg az epitópot felismerő Fab karjai a HER2 receptor extracelluláris doménjének membránközeli részére specifikusak. Kötődésével megakadályozza a extracelluláris domán lehasítódását, a receptorok homo/heterodimerizációját, ugyanakkor ADCC indukcióra és a sejtfelszíni receptorok koncentrációjának csökkentésére irányuló hatással is rendelkezik⁵⁶.

4.4.3.3 Trastuzumab-közvetített ADCC

Az ADCC a veleszületett – természetes – immunrendszer általi vírus és tumor elimináló reakció ⁶⁵. Legjellemzőbb effektora a természetes ölüsejt – natural killer, NK sejt –, amely a célsejtet annak felszíni receptoraira specifikus antitestek révén ismeri fel, majd apoptotizálja azt ⁶⁵. 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 citotoxikus granulumainak irányított exocitózisa a target sejt irányába ^{66,67,65}. A szinapszis formáció szigorúan szabályozott lépések sorozata, amelynek eredménye egy jól strukturált, nagyon stabil, szoros sejt-sejt kapcsolat ⁶⁶. A cSMAC (central supramolecular activation cluster) tartalmazza az elsődleges, az interakció specifikusságát biztosító molekulákat, míg a pSMAC (peripheral SMAC) az LFA-1 integrin fehérjét ^{66,67}. 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 fuzionálnak a plazmamembránnal ^{66,68,69}. Az IS-be került perforinok nagy méretű, transzmembrán pórusokat formálnak utat biztosítva a granzimek számára a célsejt citoszólja felé ^{70,69}. 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 kaszpáz-független sejthalált indukál, míg a GzB kaszpáz 3,7 -függő és -független úton is képes kiváltani a target sejt apoptózist ^{69,71}. Az ADCC főbb eseményeit az **6. ábra** szemlélteti.



6. ábra A trastuzumab által közvetített antitest-függő celluláris citotoxicitás (ADCC) sematikus ábrázolása (Alamy internetes ábra nyomán: [alamy.com](https://www.alamy.com))

Az ADCC egy többlépéses immunológiai reakció, amely során a trastuzumab (anti-HER2 ellenanyag) epitópja a tumorsejt (célsejt) felszínén expresszáldó HER2 molekula extracelluláris doménjén található. A trastuzumab Fc régiójához viszont az ADCC effektor résztvevője, az NK sejt CD16 Fc receptora kapcsolódik, így kialakítva az immunológiai szinapszist. Ennek következtében az immunsejt irányított exocitózissal perforin és granzim molekulákat juttat a célsejtbe és indukálja annak apoptózist

66, 67

5 Célkitűzés

Az emlődagamos 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 hatékonysága 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 ⁷². *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.

6 Anyagok és módszerek

6.1 Anyagok és pufferek

6.1.1 Anyagok

Vegyszer	Gyártó	Katalógusszám
DMEM / F12	Sigma	D8437
FBS	Biosera	FB-1090/500
inzulin	Eli Lilly Nederland B.V.	HI0219
penicillin / streptomycin	Biosera	LM-A4118/100
DMEM	Biosera	LM-D1111
α -MEM	Sigma	M8042
MEM-NEAA	Gibco	11,140-050
Na-piruvát	Gibco	35,050-061
glutamin	Gibco	35,050-061
IL-2	Novartis Hungária Kft.	PHC0026
ECIS plate (8W10E)	Ibidi	72010
trastuzumab (Herzuma®)	EGIS Pharmaceuticals	
HCS plate (Cell Carrier Ultra)	PerkinElmer	6055302
calcein-AM	Sigma	177,783
FDA Approved Drug library SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2	Enzo	BML-2843-0100
cetuximab (Erbix®)	Merck	
LDH reagents	Invitrogen-Thermo Scientific	C20301
DRAQ5	eBioscience-Thermo Fisher Scientific	65-0880-96
Sunitinib malate	Sigma	PZ0012
10x PBS	Lonza	BE17-517Q
diszpáz	Gibco	17,105-041
TCA	Molar Chemicals Ltd.	09,290-101-190
SRB	Sigma	230,162
Tris bázis	Sigma	T1503
Cell Tracker Blue	Invitrogen-Thermo Scientific	C2110
formalin	Molar Chemicals Kft	03300-101-340
Triton X-100	Sigma	T8787
BSA	VWR	421501J
anti-granzim B ellenanyag	Biolegend	515,405
HER-2-Fc	R&D systems	1129-ER
IFN- γ ELISA kit	R&D systems	SIF50C
etanol	VWR	85829.460
RNáz	Sigma	R6513
Tris-HCl	Sigma	T-3253-500G
Igepál	Alfa Aesar	CA-630
Na-deoxikolát	Sigma	D-6750
NaCl	Sigma	31,016-6
EDTA	Molar Chemicals Kft	02980-101-190
PMSF	Sigma	P7626

Vegyszer	Gyártó	Katalógusszám
PIC	Sigma	P8340
glicerol	VWR	24388,32
SDS	Bio-Rad	1610302
DTT	PanReac AppliChem	A2948,0005
brómfenol kék	Reanal	2187
β-merkaptotetanol	Applichem GmbH	A1108,0100
nitrocellulóz membrán	Sigma (Amersham)	10600016
Tris	Molar Chemicals Kft	09360-203-190
KCl	Molar Chemicals Kft	04350-101-190
Tween20	VWR	0777-1L
ECL-Pico reagens	Thermo Scientific	34,58
ECL-Femto reagens	Thermo Scientific	34,094
nyúl anti-LC3B ellenanyag	Novus Biologicals	NB100-2220
egér anti-β-aktin ellenanyag	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
egér anti-HER-2 ellenanyag	Sigma	OP-15
nyúl anti-pAkt (S473) ellenanyag	Cell Signaling	4058S
nyúl anti-Akt ellenanyag	Cell Signaling	4691S
kecske anti-nyúl IgG HRP-konjugált ellenanyag	Cell Signaling	7074S
ló anti-egér IgG HERp-konjugált ellenanyag	Cell Signaling	7076S
pLP-1 plazmid	Invitrogen	ViraPower™ Lentiviral Directional TOPO™ Expression Kit: Invitrogen: K495000
pLP-2 plazmid		
pLP-VSV-G		
pWOX-EGFP	Ajándék Prof. Dr. Tózsér Józseftől	
Lipofectamine 3000 transzfektáló kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	L3000-008
polybren: Hexadimetrin bromid	Sigma	H9268-5G
agaróz	Sigma	A9539-500G
DMSO	Molar Chemicals Kft	02610-101-340
Pluronic-F127	Sigma	P2443
Annexin V-Alexa Fluor 647	Invitrogen-ThermoFisher Scientific	A23204
DAPI	PanReac AppliChem	A1001
metanol	Molar Chemicals Kft	05730-101-430
anti-egér IgG Alexa Fluor488	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	A11001

6.1.2 Pufferek

Puffer neve	Komponensei
RIPA puffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl, 1% igeal, 0,25 % Na-deoxikolat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
SDS mintapuffer	0,31 M Tris-HCl (pH 6,8), 50 % glicerol, 10 % SDS, 100 mM DTT, 0,01 % brómfenol kék, 1 M β -merkaptoetanol
Western blot blokkoló puffer	5 % zsírszegény tejpor mosó pufferben
Western blot mosó puffer (pH 7,4)	TBS: 25 mM Tris; 0,136 M NaCl; 2,682 mM KCl; 0,1 % Tween20
kímélő strippelő puffer (pH 2,2)	15 g glicin, 1 g SDS, 10 ml Tween20 1 l-re dH ₂ O-val kiegészítve

6.2 Módszerek

6.2.1 Sejtvonalak

A kísérletes munkám során alkalmazott sejtvonalakat, illetve a fenntartásukhoz használt tenyésztő médiumok összetevőit az **4. táblázatban** tüntettem fel. Valamennyi sejttípus tenyésztése 37 °C-ot, 95 %-os páratartalmat, valamint 5% CO₂-t biztosító inkubátorban történt. A sejtek mikoplazma-mentességét rendszeresen LookOut Mycoplasma PCR kit segítségével ellenőriztük.

4. táblázat A kísérletek során felhasznált sejtvonalak és tenyésztő médiumaik

Sejtvonal neve	Sejtvonal típusa	Tenyésztő médium összetétele
JIMT-1	adherens ER ⁻ /PR ⁻ , HER2 ⁺ humán emlő adenokarcinóma Trastuzumab (Herceptin)-rezisztens	· 80 % DMEM / F-12 médium · 20 % FBS · 0,3 U / ml humán inzulin · 1 % penicillin / streptomycin
SKBR-3	adherens ER ⁻ /PR ⁻ , HER2 ⁺ humán emlő adenokarcinóma Trastuzumab (Herceptin)-szenzitív	· 90 % DMEM (4,5 g / l glükóz) médium · 10 % FBS · 1 % penicillin / streptomycin
MDA-MB468-HER-2	adherens ER ⁻ /PR ⁻ /HER-2 ⁻ humán emlő adenokarcinóma <i>in vitro</i> indukált HER-2 pozitivitás	· 90 % DMEM (4,5 g / l glükóz) médium · 10 % FBS · 1 % penicillin / streptomycin
MKN-7	adherens HER-2 ⁺ humán gyomor adenokarcinóma	· 90 % DMEM (4,5 g / l glükóz) médium · 10 % FBS · 1 % penicillin / streptomycin
CD16.176 V.NK-92	szuszpenziós, magas affinitású FcγRIIIA (CD16)-t expresszáló NK sejtvonal	· 80 % α-MEM médium · 20 % FBS · 1 % MEM-NEAA · 1 %-Na-piruvát · 1% penicillin / streptomycin · 100 IU / ml IL-2

6.2.2 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:

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

ahol 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.

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

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

A 96-lyukú HCS lemezekre JIMT-1 médiumot mértem (50 µl/lyuk). Minden lyukba 10^4 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 Kalcein-AM festékkel inkubáltam 1 órán keresztül 37 °C-on. A nem-fluoreszcens kalcein-AM passzív diffúzióval jut be a sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok lehasítják az AM (acetoxi-metil-észter) csoportját, majd az így keletkező kalcein csapdába esik a sejten belül és megfelelő gerjesztés (488 nm) hatására fluoreszkál. A nem-fluoreszcens kalcein-AM passzív diffúzióval jut be a sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok lehasítják az AM (acetoxi-metil-észter) csoportját, majd az így keletkező kalcein csapdába esik a sejten belül és megfelelő gerjesztés (488 nm) hatására fluoreszkál. 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 2×10^4 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 Kalcein-pozitív JIMT-1 sejtek számát a „Find cells” szoftver modul segítségével határoztuk meg (csatorna: calcein; módszer: B; common threshold: 0,39; area: > 600 μm^2 ; 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.

6.2.4 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{l/lyuk}$:20 $\mu\text{l/lyuk}$) hozzáadása, és 20 perc elteltével az abszorbancia meghatározása történt MultiskanTM 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.

6.2.5 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 μ M, 1 óra, majd 10 μ M, 3 óra), JIMT-1 médiumban hígított 1000-szeresen hígított (5 μ M) 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 μ m²; 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.

6.2.6 Diszpáz esszé

A JIMT-1 sejtek kezelés hatására bekövetkező adhéziónak képességét Vilchis-Nestor CA et al.⁷³ tanulmányára alapozva némi módosítással vizsgáltam. 24-lyukú plate-ben 6×10^4 JIMT-1 sejtet kezeltem 10 μ M 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 μ l 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 μ l 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.

6.2.7 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 kokultúrát 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.

6.2.8 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.

6.2.9 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.

6.2.10 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. A Western blot során alkalmazott antitestek paramétereit a 5. táblázatban tüntettem fel.

	Antitest specificitás	Gazdafaj	Hígítás	Előhívás
elsődleges antitest	LC3B	nyúl	5000x	90 % PICO, 10% FEMTO
	β-aktin	egér	3000x	PICO
	HER-2	egér	500x	
	pAkt (S473)	nyúl	1000x	
	Akt	nyúl	1000x	
másodlagos antitest	anti-nyúl IgG, HRP-kapcsolt	kecske	2000x	
	anti-egér IgG, HRP-kapcsolt	ló	2000x	

5. táblázat A Western blot kísérletek során alkalmazott antitestek

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

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 felülűszoját 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.

6.2.12 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 (JIMT-1 sejtek adhéziónak megakadályozásához, 45 perc, szobahő). A JIMT-1 szferoidokat 20 μ M sunitinib-bel kezeltük elő 1 órán át, majd a 10 μ M Cell Tracker Blue-val megfestett NK sejtek (E:T = 20:1), valamint a trastuzumab ellenanyag (10 μ g/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.

6.2.13 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 μ g / 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 μ m²; 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%).

6.2.14 HER-2 immunfestés

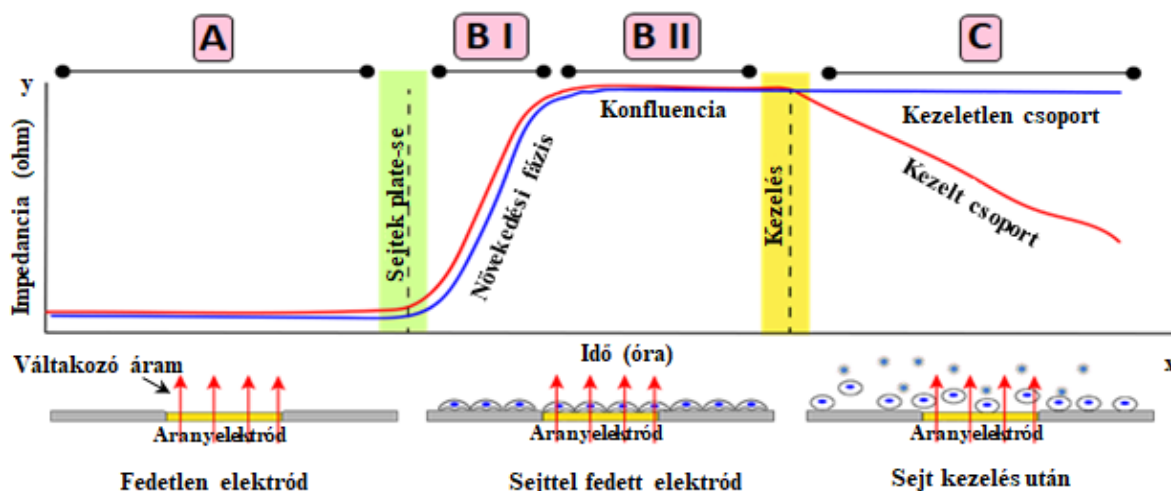
A JIMT-1 médiummal bevont 96-lyukú HCS plate-be 1×10^4 /lyuk JIMT-1 sejtet $20 \mu\text{M}$ sunitinibbel kezeltem elő 1 órán át, melyet $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ Alexa Fluor647-konjugált trastuzumab-tartalmú médiummal $10 \mu\text{M}$ koncentrációra hígítottam és 3 órán keresztül hígítottam. Az inkubáció 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).

6.2.15 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.

7 Eredmények

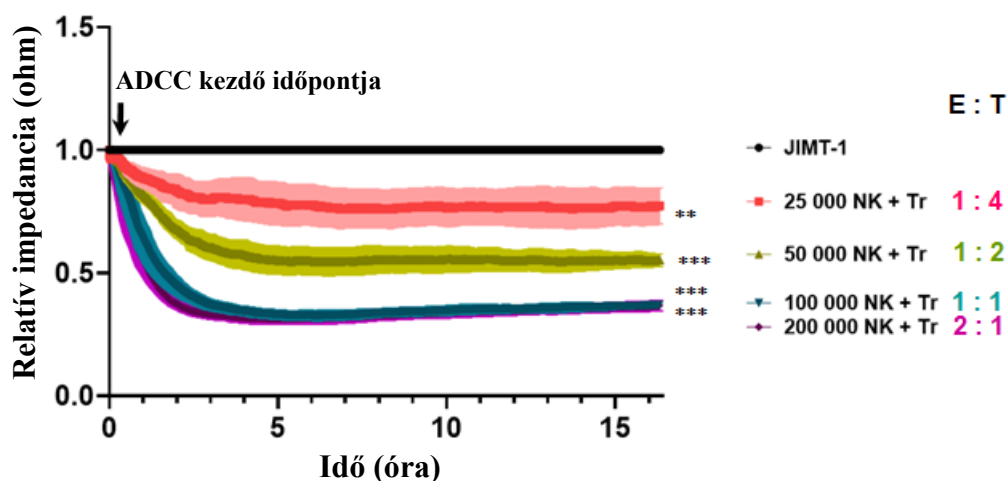
7.1 ADCC paramétereinek beállítása ECIS módszerrel



7. ábra Az impedancia értékek alakulása az ECIS mérés során (Applied biophysics honlap nyomán; <https://www.biophysics.com/whatIsECIS.php>)

Az impedancia értékek (y tengely) az aranyelektrodok adherens sejttel való borítottságával (x tengely) egyenesen arányos. Az üres elektród impedanciája zero (A szakasz), amely a sejtek folyamatos letapadásával fokozatosan emelkedik (B I szakasz). A 100 %-os konfluencia egy plató fázis formájában rajzolódik ki az impedancia görbén (B II szakasz), míg a kezelés hatására fellépő impedancia változás a sejtek felválásának következménye (C szakasz). Az ADCC kísérletünket minden esetben ezen konstans fázis elérését követően indítottuk el az NK sejtek és a trastuzumab anti-HER2 ellenanyag JIMT-1 sejtekhez történő hozzáadásával.

A JIMT-1 és NK sejt alkotta ADCC ko-kultúra eredményét a **8. ábra** mutatja. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott effektor - target sejt arányok (E : T) eltérő, ugyanakkor szignifikáns ADCC hatékonyságot eredményeztek. Továbbá azt is megtudtuk, hogy elegendő a 3 órás inkubációs időn belül maradnunk.

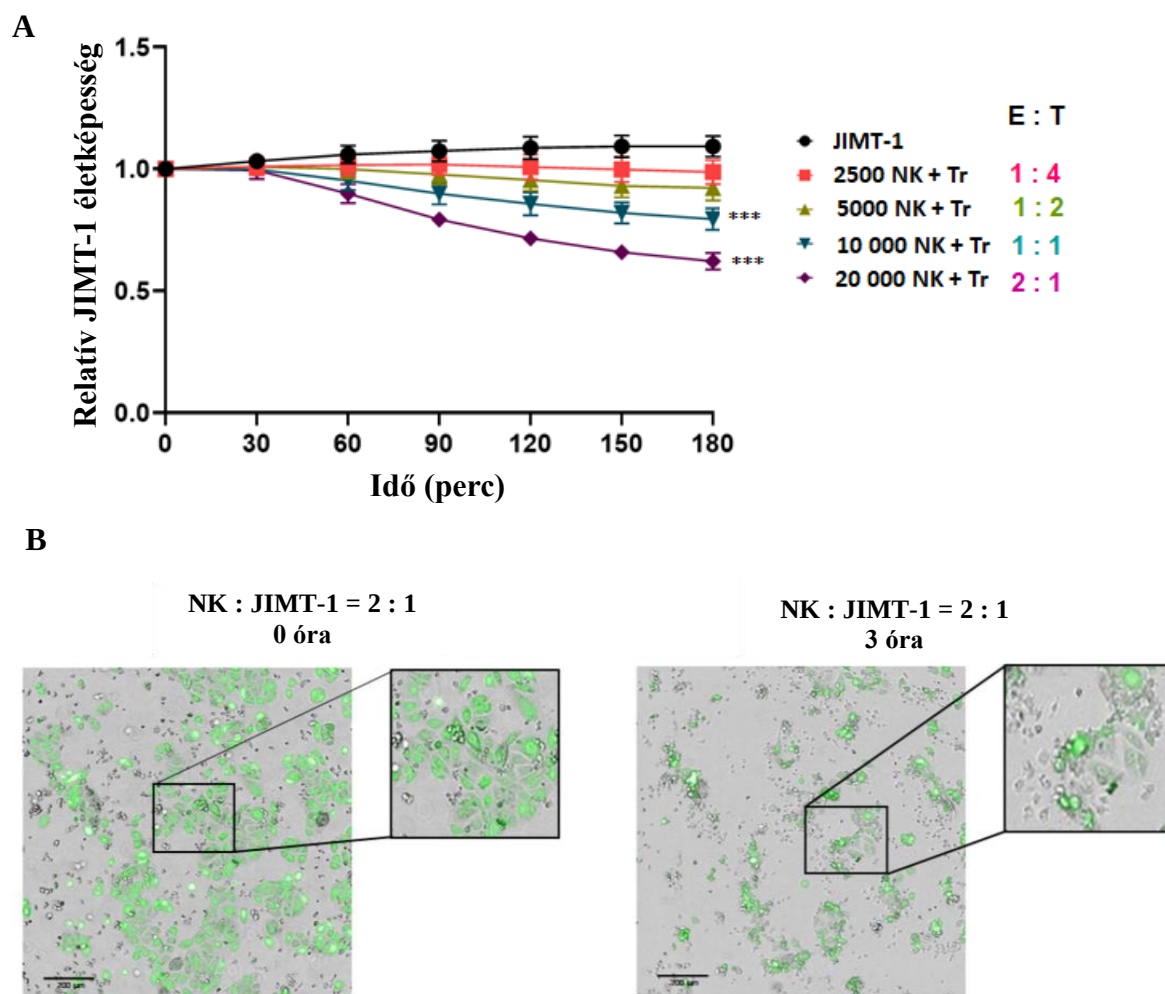


8. ábra ADCC optimalizálása ECIS készülékkel

A JIMT-1 csoport effektorok és antitest nélkül vettek részt a kísérletben és szolgáltak referenciaként, mint maximális impedancia értékek. Az ADCC eléréséhez 4-féle effektor target aránnyal (E:T = 1:4, 1:2, 1:1 és 2:1) és egyféle trastuzumab (Tr, anti-HER2 ellenanyag) koncentrációval (10 µg/ml) dolgoztunk. Az NK sejteket a trastuzumab-tartalmú JIMT-1 médiumban az impedancia plató fázisának elérését követően adtuk a target sejtekhez (*ADCC kezdőpontja*, ~ 24 órával a plate-elés után). A diagram 3 egymástól független kísérlet átlagát mutatja ($\pm$ SEM). A statisztikai elemzést 2-utas ANOVA és Tukey-teszt segítségével végeztük. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

7.2 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 átvittük egy high-content screening-re (HCS) 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 kalcein-alapú ADCC kísérlet eredményét a **9. ábra** szemlélteti. 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.

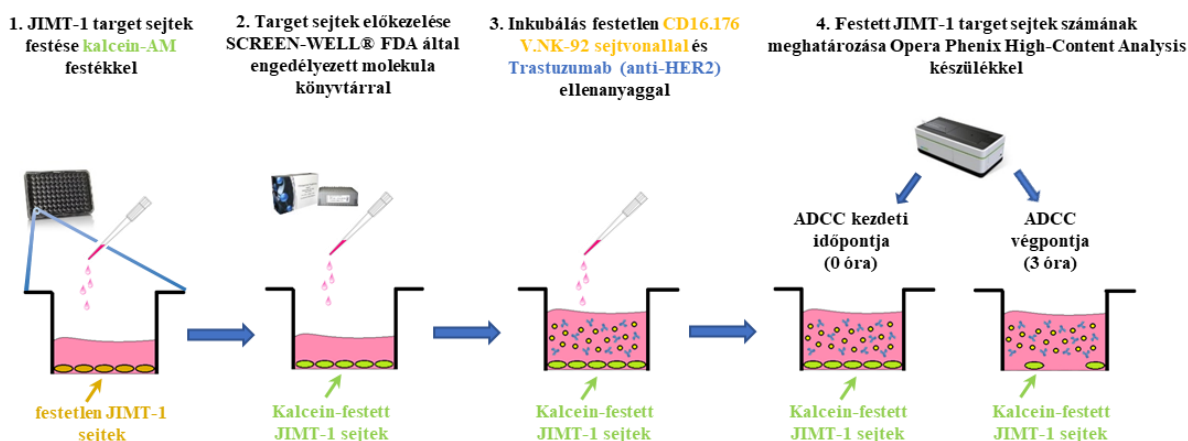


9. ábra ADCC optimalizálása kalcein-AM-alapú festési módszer és fluoreszcens mikroszkóp használatával

(A) A JIMT-1 sejtek életképességét kalcein-AM-festéssel is nyomon követtük, ahol a festett sejtek fluoreszcenciája alapján határoztuk meg az ADCC kezdőpontja (0 óra) és végpontja (3 óra) közötti célsejt pusztulást. A képeket Opera Phenix mikroszkóppal rögzítettük (10x száraz objektív; 0,3 numerikus apertúra; nem-konfokális mód; ex: 488 nm; em: 500-550 nm). A kísérlet során 1:4, 1:2, 1:1, valamint 2:1 E:T arányokat alkalmaztunk 10 µg/ml Tr jelenlétében, míg a kontroll (JIMT-1) csoport esetén elhagytuk az NK sejtek és anti-HER2 antitestet a rendszerből. Az adatokat 2-utas ANOVA és Tukey poszt-hoc teszttel analizáltuk. (B) Reprezentatív felvételek a kalcein-festett JIMT-1 sejtekről az ADCC kezdeti (0 óra) és végpontjában (3 óra). A skála 200 µm-t jelöl. *** $p < 0,001$

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

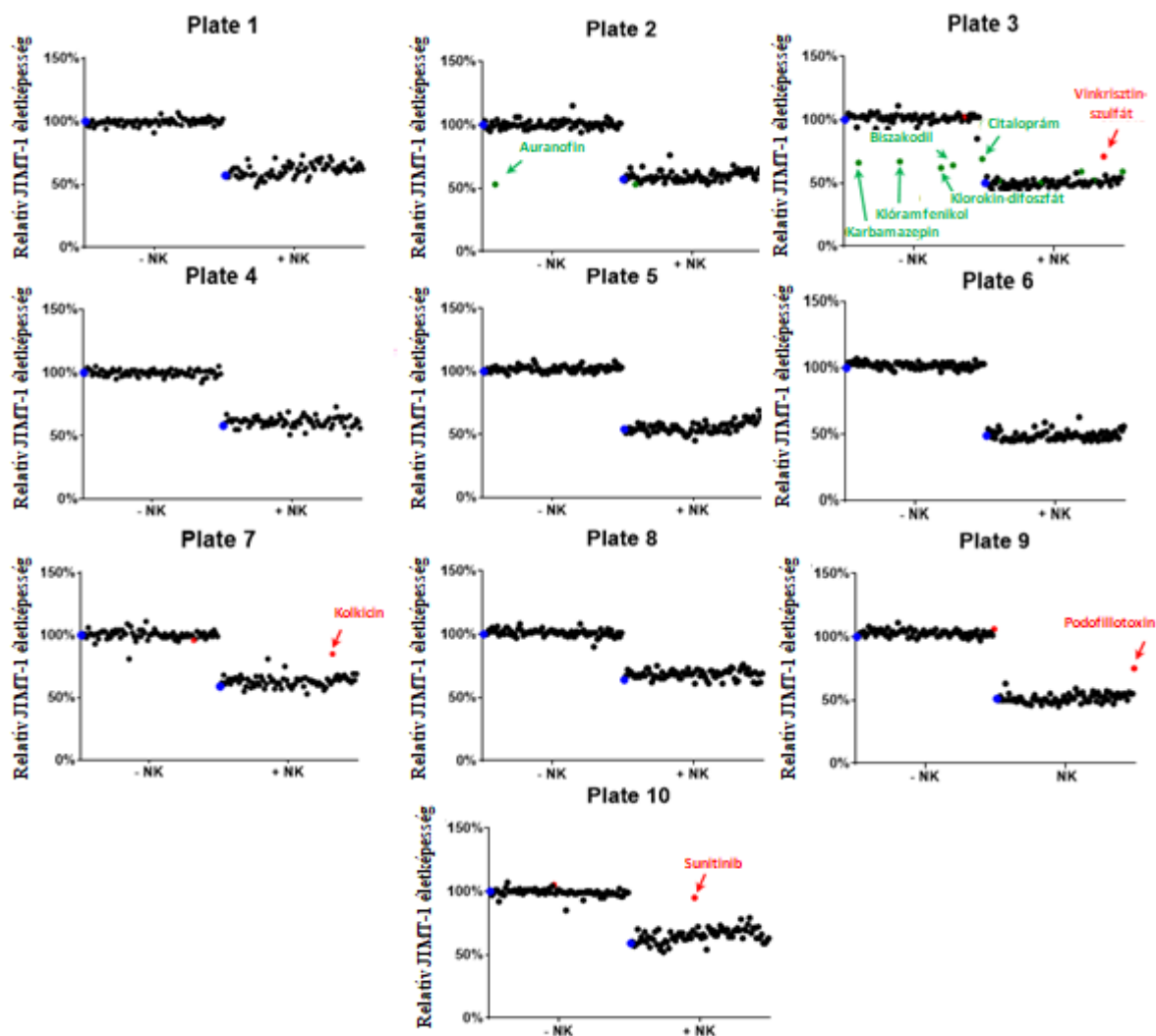
A szűrési kísérlethez kalcein-AM festési protokollt alkalmaztunk, amelynek lépéseit a **10. ábra** szemléleti.



10. ábra A kalcein-festés alapú molekulakönyvtár szűrési protokollja

(1.) A JIMT-1 sejtek jelölése kalcein-AM festékkel történt (0,5 μ M; 1 óra; 37 °C). (2.) A target sejtek mosását követően a SCREEN-WELL® molekula-könyvtár vegyületeit TECAN pipettázó robot segítségével adagoltuk a sejtekhez (20 μ M, 1 óra, 37 °C). (3.) Jelöletlen NK sejtek és trastuzumab (ADCC; E:T = 2:1; 10 μ g Tr) vagy NK sejt és antitest nélküli médium (kontroll) hozzáadása a kalcein-AM-jelölt JIMT-1 sejtekhez. (4.) A festett JIMT-1 sejtek megszámlálása Opera Phenix mikroszkóppal az ADCC kezdeti (0 óra) és végpontjában (3 óra).

A HCS esszé alatt egy 774 gyógyszerhatóanyagot tartalmazó molekula könyvtárral inkubáltuk az ADCC ko-kultúránkat. A HCS kísérlet eredményeit a **11. ábra** mutatja. 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, podofilotoxin és sunitinib) nyújtott legalább 20 %-os védelmet az ADCC-vel szemben.

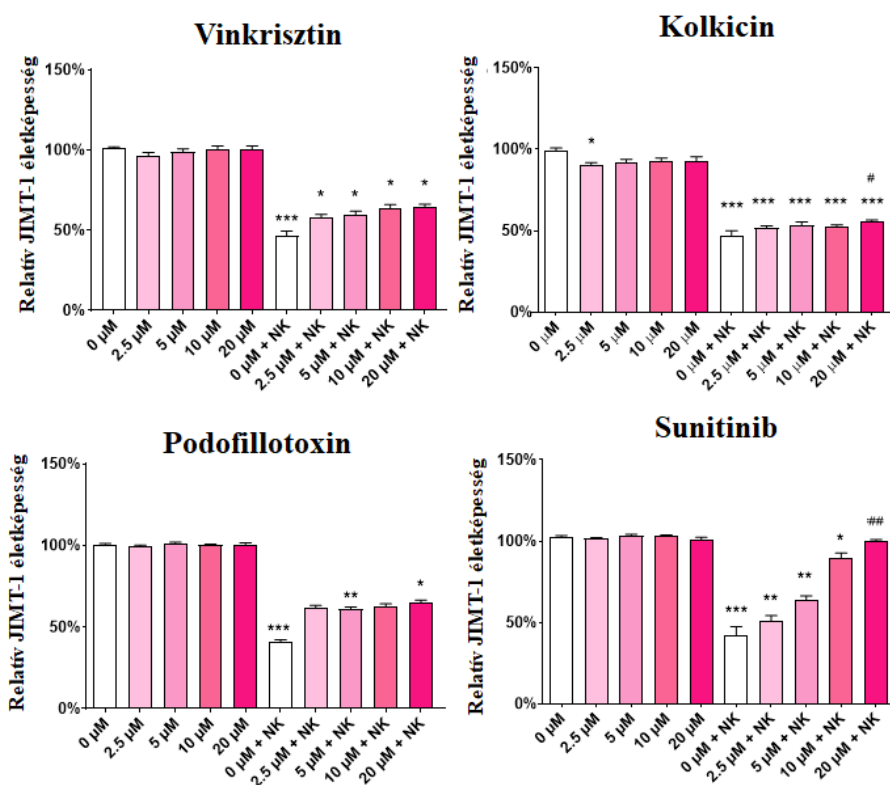


11. ábra ADCC modulátorok azonosítása HCS mikroszkóppal

A kalcein-festett JIMT-1 sejteket 1 órán át inkubáltuk a gyógyszerhatóanyagokkal (20 μ M, - NK és + NK plate). Az előkezelési idő letelte után a „+ NK” plate tartalmazta az ADCC-t biztosító JIMT-1 és NK sejtek ko-kultúráját Tr jelenlétében (E:T = 2:1; 10 μ g/ml), míg a „- NK plate” csak a festett JIMT-1 sejteket. A festett JIMT-1 sejtek megszámlálása két időpontban (0 és 3 óra; előzetes kísérletek alapján: 7., 8. ábra) történt HCS fluoreszcens mikroszkóppal. A diagramon minden pont 1-1 lyukat, azaz 1-1 kezelést jelöl, amelyek közül a kék pontok a DMSO oldószer kontrollra utalnak. A zöld objektumok azok a szerek, amelyek a JIMT-1 sejtekre toxikusak önmagukban is (NK sejtek nélkül), míg a pirosak legalább 20 %-os csökkenést indukáltak az NK sejtek-okozta ADCC reakcióban (ADCC inhibitorok).

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

A szűrés megbízhatóságának ellenőrzése érdekében megerősítő méréseket végeztünk az ADCC inhibitoraival (12. ábra). Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy mind a négy gyógyszerhatóanyag gátló hatása reprodukálható (10 μ M koncentráció).

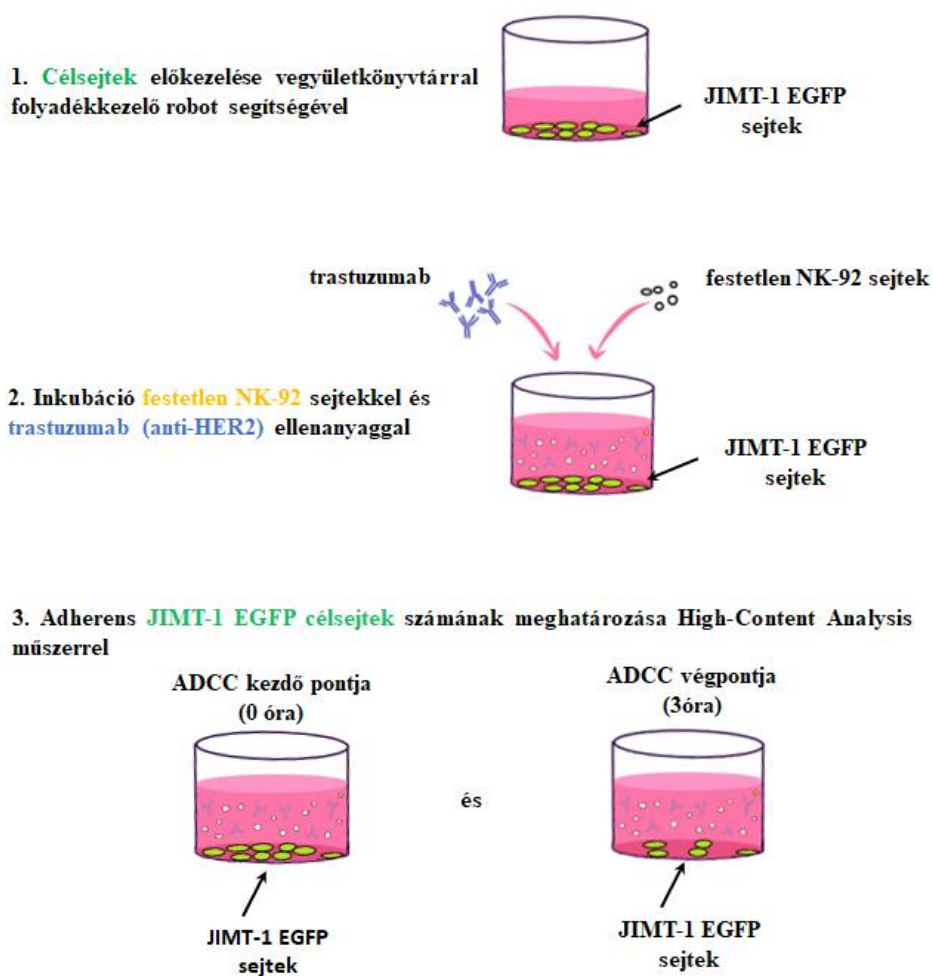


12. ábra A hit vegyületek ADCC-re gyakorolt gátló hatásának kvantitatív meghatározása

Kalcein festést követően a JIMT-1 sejteket 1 órán át kezeltük elő a négy hatóanyaggal (a diagramon szereplő koncentrációk kétszeresével), majd az NK sejteket is hozzáadtuk azonos térfogatban. A JIMT-1 sejtek életképességét HCS mikroszkóppal követtük nyomon. A diagramok egymástól 3 független kísérlet átlagát mutatják be ($\pm$ SEM). Az ADCC hatékonyság statisztikai elemzéséhez Kruskal-Wallis tesztet és Dunn poszt-hoc tesztet alkalmaztunk (vinkrisztin, podofillotoxin és sunitinib), illetve 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszt kombinációját (kolkicin). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A (*) az ADCC nélküli és az ADCC csoportok közötti változás mértékére utal. A kettőskereszt (#) a „0 μ M + NK” elnevezésű csoporttól való szignifikáns eltérésre utal a + NK csoporton belül.

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

A **10. ábrán** bemutatott szűrési protokoll leegyszerűsítésével teszteltünk egy általunk összeállított kis molekulakönyvtárat is, amelynek lépéseit a **13. ábrán** tüntettem fel. Ebben az esetben az ADCC target sejtei EGFP-t kifejező JIMT-1-k, amelynek előállításának lépései a **6.2.11 fejezetben** ismertettem. Tizenkilenc különböző vegyület – valamint DMSO, mint oldószer kontroll – négy példányban volt jelen a 96-lyukú plate-n (**14. ábra**). A hatóanyagok között szerepelt az a három mikrotubulus gátlószer (kolkicin, vinkrisztin és podofilotoxin) is – az esszé pozitív kontrolljaiként –, amelyeket ADCC-t gátló szerként azonosítottunk a kalcein-festésen alapuló HCS kísérleteinkben (**11., 12. ábra**).



13. ábra EGFP expresszió alapú molekulakönyvtár szűrési protokoll

(1.) A JIMT-1-EGFP sejtek előkezelése a kis molekulakönyvtárral TECAN pipettázó robot segítségével (20 μ M, 1 óra, 37 °C) valósult meg. (2.) Jelöletlen NK sejtek és trastuzumab (ADCC; E:T = 2:1; 10 μ g Tr) vagy NK sejt és antitest nélküli médium (kontroll) hozzáadása a JIMT-1-EGFP sejtekhez. (3.) Az EGFP-pozitív sejtek megszámlálása Opera Phenix mikroszkóppal az ADCC kezdeti (0 óra) és végpontjában (3 óra).

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	Cisp	Betu	NQDI	Fluo	Tann	Conc	Nari	Ceru	Colc	DMSO	DMSO
B	DMSO	Fluo	DMSO	Colc	Betu	Nari	Cisp	Temo	NQDI	Betu	Podo	DMSO
C	DMSO	Pent	Dexa	Vinc	Etop	Temo	Tann	Isat	Tann	Gall	Vinc	DMSO
D	DMSO	Tann	Gall	Podo	Betu	Fluo	Etop	Pent	Dexa	Vinc	Isat	DMSO
E	DMSO	Etop	Temo	Quer	Pent	Fise	Colc	Isat	Conc	Colc	Quer	DMSO
F	DMSO	Isat	Ceru	Cisp	Ceru	Cisp	Temo	Fise	Pent	Vinc	Fise	DMSO
G	DMSO	Nari	Conc	DMSO	Gall	Ceru	Dexa	Gall	Etop	Quer	Conc	DMSO
H	DMSO	Quer	Fise	Fluo	DMSO	NQDI	Podo	NQDI	Podo	Nari	Dexa	DMSO

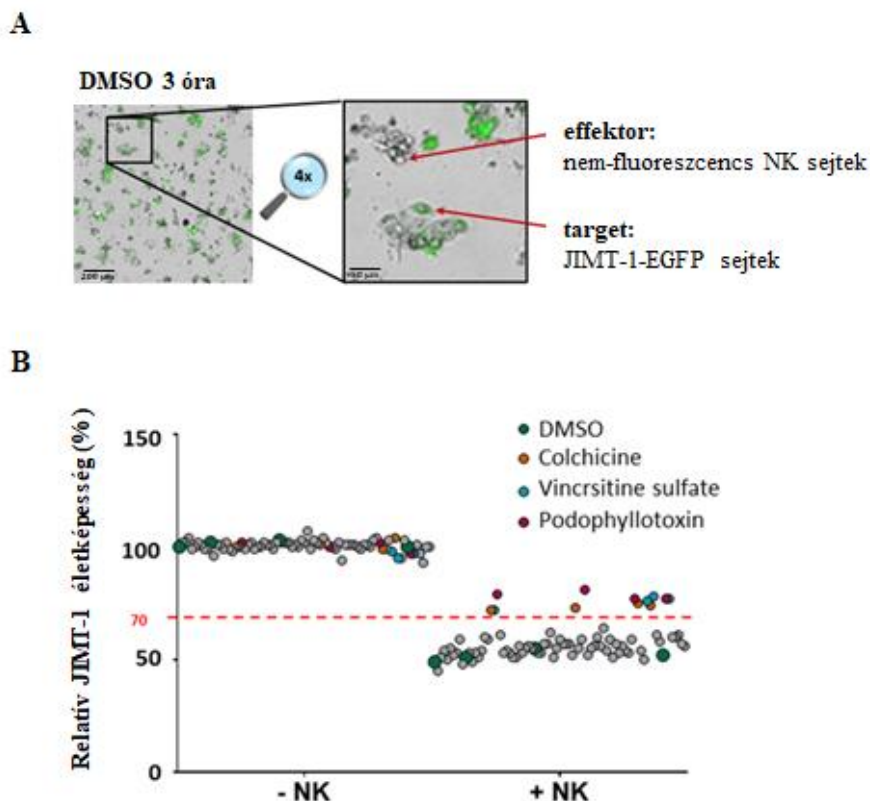
B

	Név	Pozíció	Rövidítés
1	Dimetil-szulfoxid	1., 12. oszlop; B3; G4; H5; A11	DMSO
2	Ciszplatin	A2; B7; F4; F6	Cisp
3	5-fluorouracil	D6; H4; A5; B2	Fluo
4	Pentoxifillin	C2; D8; E5; F9	Pent
5	Tanninsav	A6; C7; C9; D2	Tann
6	Etopozid	D7; E2; G9; C5	Etop
7	Izatin	C8; D11; E8; F2	Isat
8	Naringenin	A8; B6; G2; H10	Nari
9	Quercetin	E4; E11; G10; H2	Quer
10	Betulin	A3; B5; B10; D5	Betu
11	Dexametazon	C3; D9; G7; H11	Dexa
12	Gallotannin	C10; D3; G5; G8	Gall
13	Temozolomid	B8; C6; E3; F7	Temo
14	Cerulenin	G6; A9; F3; F5	Ceru
15	Konkanavalin-A	G3; G11; A7; E9	Conc
16	Fisetin	F8; F11; H3; E6	Fise
17	NQDI-1	H6; H8; A4; B9	NQDI
18	Kolkicin	E7; E10; A10; B4	Colc
19	Vinkrisztin	C4; C11; D10; F10	Vinc
20	Podofillotoxin	H7; H9; B11; D4	Podo

14. ábra A HCS ADCC esszé teszteléséhez használt vegyületkönyvtár

(A) Minden vegyület négy ismétlésben van jelen a könyvtárban, míg a 96 lyukú plate első és utolsó oszlopába, illetve néhány további lyukba DMSO oldószer kontrollt mértünk be. A kalcein-alapú szűrőssel azonosított mikrotubulus gátlók (kolkicin, vinkrisztin és podofillotoxin) színes háttérrel vannak kiemelve. (B) A vizsgált vegyületek nevei, pozíciói, illetve rövidített elnevezései.

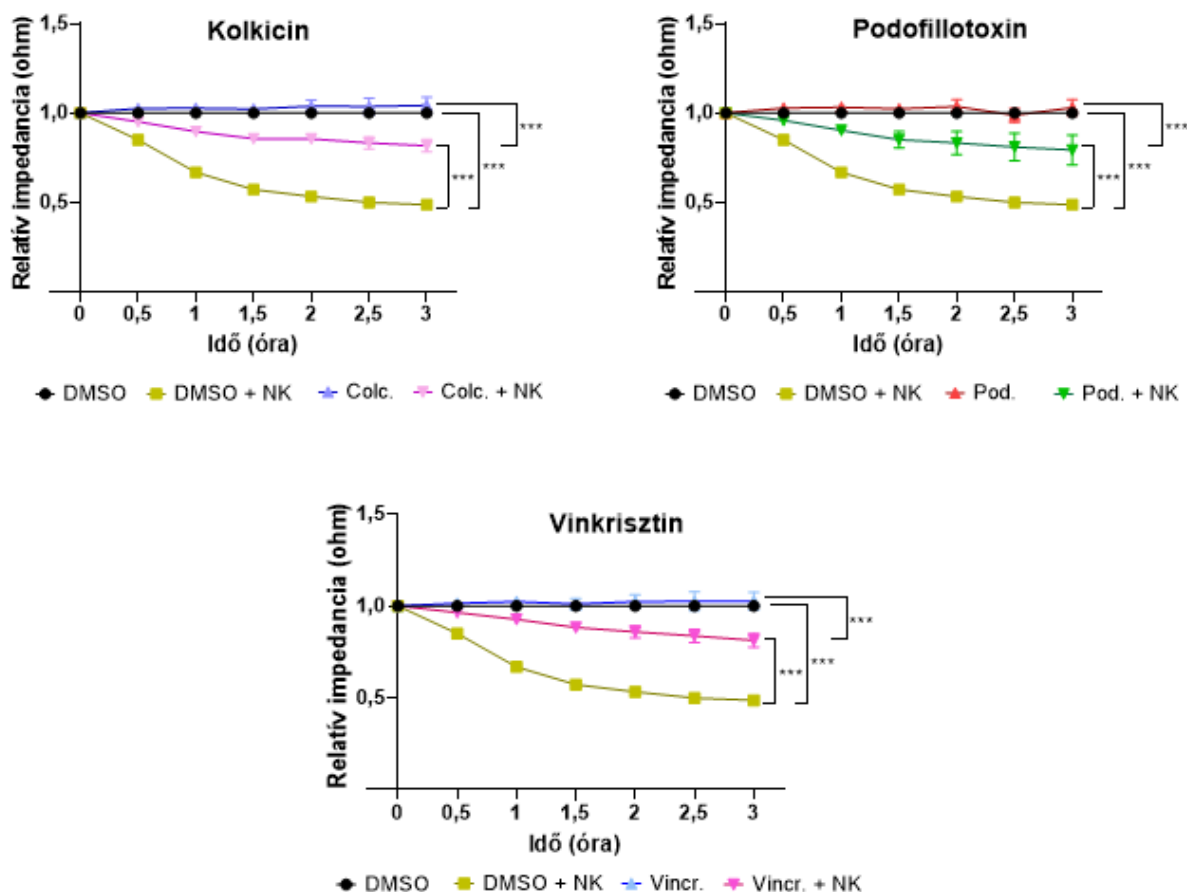
A transzdukált JIMT-1 sejtek 488 nm-es hullámhosszon történő gerjesztésük alapján egyértelműen elkülöníthetők a nem-fluoreszkáló NK sejtektől. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az NK sejtek-indukálta sejtpusztulás (50 % „+ NK csoportban) reprodukálhatóan detektálható az általunk optimalizált rendszerben. A megismételhetőségre a három korábban (12. ábra) már „hit”-ként azonosított mikrotubulus gátlószer újbóli azonosítása enged következtetni, ugyanakkor önmagában egyik szer sem indukált citotoxikus reakciót a „– NK” csoportban (15. ábra).



15. ábra Egy házi vegyületkönyvtár tesztelése *in vitro* ADCC modellben

(A) Az ADCC reakció végén (3 óra inkubáció után) készült felvétel, amelynek egy része 4x nagyítással mutatja a nem-fluoreszcens effektor NK és a zölden fluoreszkáló JIMT-1sejteket. A kép rögzítése Opera Phenix HCS mikroszkóppal történt (10x objektív). A méretarányos skála 200 µm. (B) Az ADCC kísérlet célsejtjeiként az EGFP-transzdukált JIMT-1 emlőkarcinóma sejtvonalat és CD16.176 V.NK-92 citotoxikus immunsejtet használtunk. Az alkalmazott E : T arány 2 : 1 volt. A „– NK” csoport esetén a JIMT-1-EGFP, NK sejtek és anti-HER2 antitest nélkül, míg a „+ NK” csoport (ADCC) 10 µg/ml trastuzumab és az effektor hozzáadásával inkubálódtak a 3 órás kezelés időtartama alatt. Az életben maradó JIMT-1 sejtek arányát Opera Phenix fluoreszcens mikroszkóprendszerrel követtük nyomon. Az NK sejtek ~ 50 %-os JIMT-1 sejtpusztulást eredményeztek (+ NK) a kontroll kezelésekkel összevetve (– NK). A piros szaggatott vonal jelzi a küszöbértéket (≥ 70 % viabilitás), amely a DMSO-val kezelt ADCC hatékonysághoz képest 20 %-os gátlást jelent.

A HCS kísérletek közös jellemzője, hogy a szűréssel azonosított vegyületek hatásának megerősítését egy eltérő technikával kell igazolni ⁹⁴. Ehhez az ADCC kvantitálására alkalmas ECIS gold standard módszert választottuk, a korábban már ismertetett kísérletes paraméterekkel, amelynek eredményeit a **16. ábrán** láthatjuk. Valamennyi esetben 2 : 1 E :T arány 50 % körüli JIMT-1 apoptózist eredményezett, amely a „hit”-ek jelenlétében markánsan visszaesett.

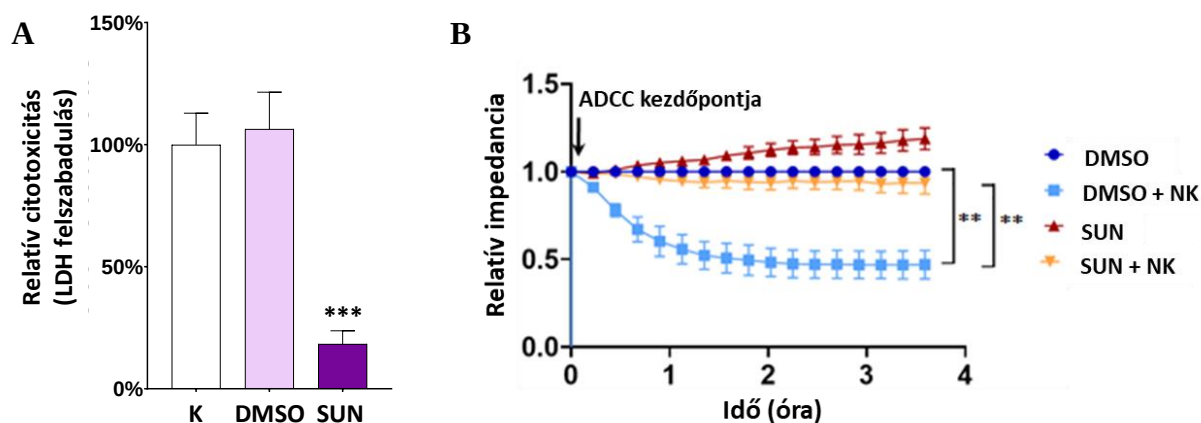


16. ábra ADCC-t gátló mikrotubulus gátlószerek megerősítése ECIS esszével

A kísérlet során követett paramétereit az Anyagok és módszerek fejezetben ismertettem korábban. Az impedancia értékek statisztikai kiértékelését 2-utas ANOVA és Tukey poszt-hoc teszttel végeztem. A * a 3 órás időpontban tapasztalt impedancia értékek közötti eltérésekre utal. A diagramok 3 egymástól független kísérletből származó adatok átlagát ábrázolják ($\pm$ SEM). *** $p < 0,001$

7.6 *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. A mikrotubulus organizációt gátlószerek (kolkicin, vinkrisztin, podofillotoxin) ADCC-re kifejtett hatásuk megmagyarázható az NK sejtek citotoxikus granulumainak exocitózisának megbénításával ⁷⁵. Ezen túlmenően azért döntöttünk a sunitinib további felhasználása mellett, mert a legnagyobb ADCC gátló hatást váltotta ki, amelyről a megerősítő vizsgálat kimutatta, hogy dózis-függő válaszreakció, illetve receptor tirozin-kináz gátlószerként leginkább összefüggésbe hozható a HER2 jelátviteli útvonal mechanizmusaival. 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 **(12. ábra)**. 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 **(17. ábra)**. A laktát-dehidrogenáz enzim valamennyi sejtünk citoplazmájában fellelhető, amely a sérült membránon keresztül kijut a sejtből, 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.

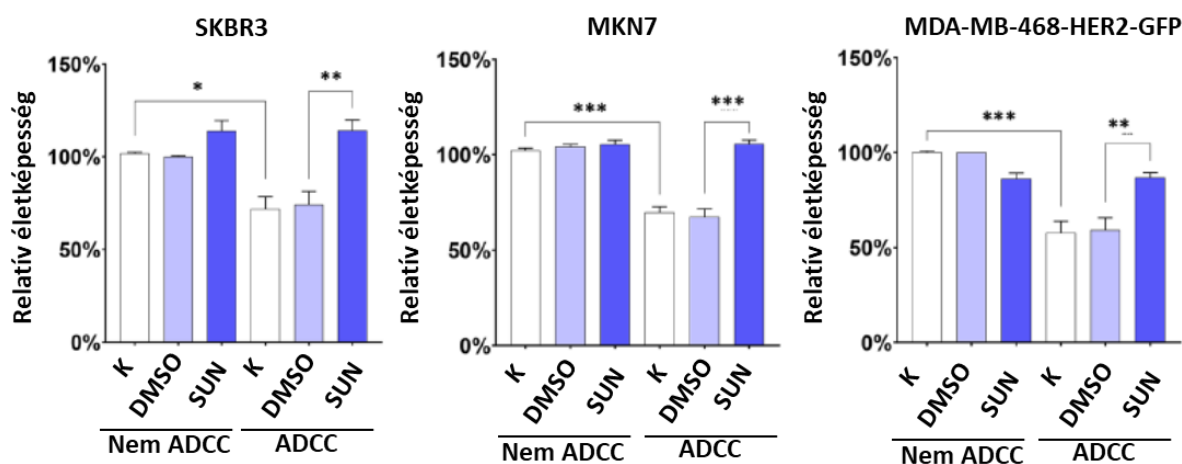


17. ábra A sunitinib ADCC-re gyakorolt gátló hatásának megerősítése LDH és ECIS módszerrel

(A) A JIMT-1 sejtek előkezelését (20 μ M, 1 óra) követően az ADCC-t trastuzumab és NK sejt tartalmú JIMT-1 médium hozzáadásával indítottuk el (10 μ M sun, E:T = 2:1, 10 μ g/ml Tr, 6 óra). A sejthalált LDH felszabadulást mérő esszével detektáltuk. A statisztikai elemzést Kruskal-Wallis és Dunn poszt-hoc teszttel végeztük. **(B)** Az ECIS kísérlet során a JIMT-1 sejtek 100 %-os konfluenciáját jelző plató fázis elérése után (~ 24 óra elteltével a plate-lést követően) történt az előkezelés (20 μ M, 1 óra). Az *ADCC kezdőpontja* jelölés utal az NK sejtek és anti-HER2 antitest JIMT-1 sejtekhez való hozzáadására. Az impedancia értékek statisztikai kiértékelését 2-utas ANOVA és Tukey poszt-hoc teszt együttesével kaptuk meg. A diagramok 3 egymástól független kísérletből származó adatok átlagát ábrázolják ($\pm$ SEM). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

7.7 A sunitinib az ADCC pán inhibitora

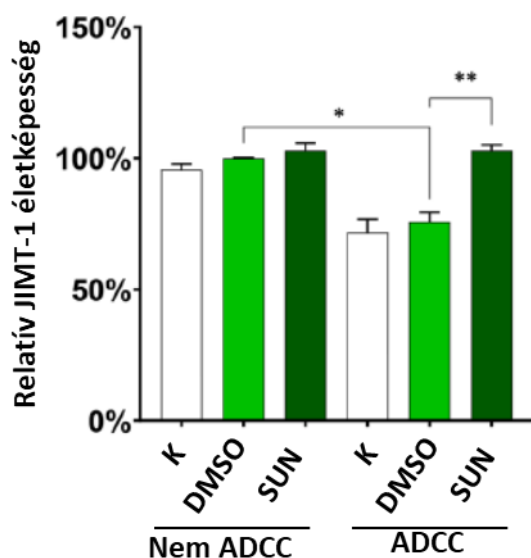
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a sunitinib hatása nem korlátozódik-e egyetlen célsejtvonalra (JIMT-1), ezért további három HER2-pozitív tumorsejtvonalon is elvégeztük a trastuzumab-közvetített ADCC reakciót. Az SKBR3, valamint az MKN7 sejtvonalak endogén, míg az MDA-MB-468 sejtvonal exogén HER2-pozitivitásúak^{96,97}. A célsejtek életképességét kalcein-festéssel és HCS mikroszkóppal mértük. Az adatok kiértékelését követően kijelenthetjük, hogy a sunitinib inhibitor hatása nem JIMT-1 sejt specifikus (**18. ábra**).



18. ábra A sunitinib ADCC hatékonyságot csökkentő hatása nem csupán JIMT-1 sejteken érvényesül

A kalcein-festett daganatos target sejtek előkezelése (20 μ M, 1 óra) után vette kezdetét maga az ADCC kísérlet (10 μ M sun; 10 μ g/ml Tr, 3 óra). A élő sejtekre utaló kalcein-pozitív objektumok meghatározása fluoreszcens mikroszkóppal történt. A viabilitás mértékét 3 különböző kísérlet átlagából számoltuk ki ($\pm$ SEM). A statisztikai analízis Kruskal-Wallis teszt és Dunn poszt-hoc teszt (SKBR3) vagy 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszt (MKN7 és MDA-MB468-HER2-GFP) felhasználásával történt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Arra is szeretnénk 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 (**19. ábra**). A kalcein-festéssel jelölt JIMT-1 sejtek számát fluoreszcens mikroszkóppal határoztuk meg, amelynek eredménye alapján megbizonyosodhattunk arról, hogy a gátló hatás továbbra is fennáll.

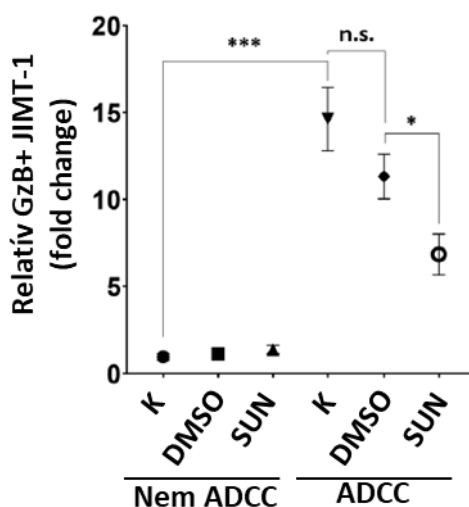


19. ábra A sunitinib gátló hatással bír az anti-EGFR-által közvetített ADCC reakcióra

A kalcein-festett, előkezelt JIMT-1 sejteket (20 μ M, 1 óra) cetuximab (2 μ g/ml, anti-EGFR ellenanyag) és NK sejt jelenlétében 3 órán keresztül inkubáltuk, és az élő sejtek számát fluoreszcens mikroszkóppal határoztuk meg. A reakció során bekövetkező statisztikai eltéréseket Kruskal-Wallis teszt és Dunn poszt-hoc tesztel elemeztük. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

7.8 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^{78,66}. 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 az ADCC-DMSO kontrollhoz képest (20. ábra).

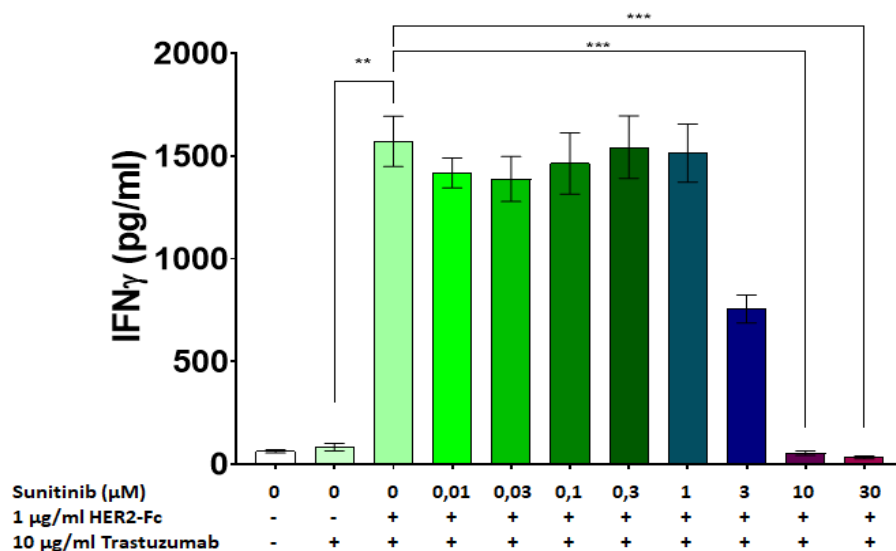


20. ábra A sunitinib mérsékeli az NK sejtek granzim b exocitózist

Az NK sejtek granzim b (GzB) felszabadulását áramlási citometriával vizsgáltuk, ahol a JIMT-1 sejteket cell tracker blue fluoreszcens festése után az előkezelési lépés, valamint a festetlen NK sejtek és trastuzumab antitest hozzáadása, majd 3 órán át történő inkubálás következett. A citotoxikus molekula detektálását az anti-granzim b Alexa Fluor 647 ellenanyaggal történő inkubálással értük el. A grafikon 4 egymástól független kísérlet átlagát ábrázolja ($\pm$ SEM). A statisztikai elemzés 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszttel történt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Ismert, hogy az NK sejtek által szekretált interferon- γ (IFN- γ) citokin számos immunológiai reakciót indít el^{79,80,81}. Az IFN- γ felelős ugyanis a daganatos sejtek proliferáció gátlásáért vagy akár apoptotikus folyamatok elindításáért⁸¹. 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

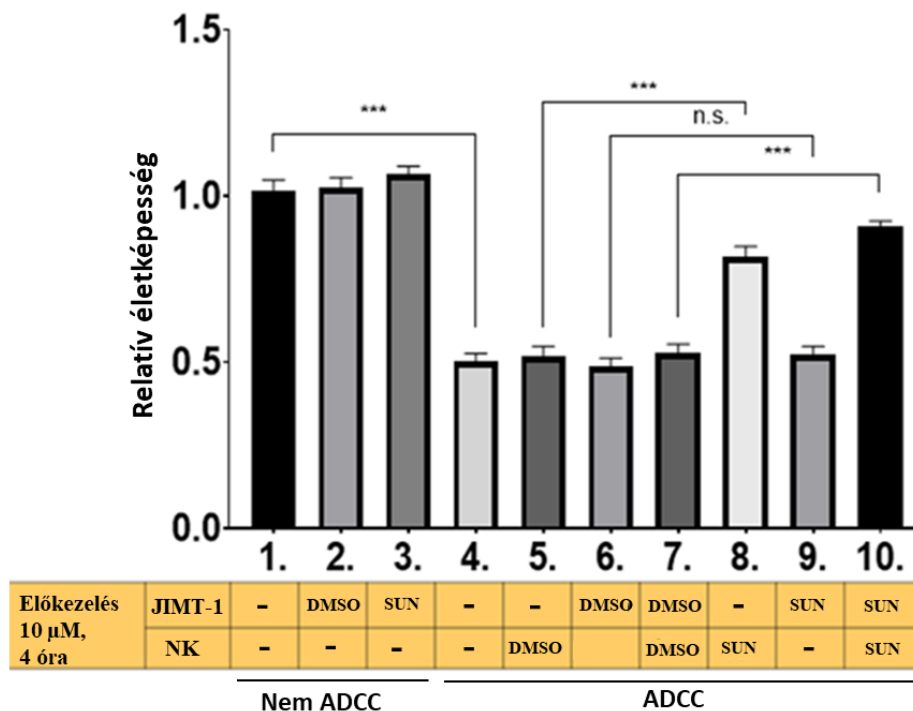
szekréciónját, ami azt jelenti, hogy a gátló hatás összecseng az áramlási citometriaival eredményeinkkel (21. ábra).



21. ábra A sunitinib gátolja az NK sejtek IFN- γ szekréciónját

Az NK sejteket trastuzumabot (10 μ g/ml), HER2-Fc fehérjét (1 μ g/ml), illetve sunitinibet (0,01 – 30 μ M) tartalmazó médiumban kezeltük. 24 óra elteltével a sejtek felülúszójából ELISA módszerrel határoztuk meg az IFN- γ koncentrációt. A grafikon 3 független kísérlet átlagát mutatja ($\pm$ SEM). A kezelések közötti statisztikai eltéréseket Kruskal-Wallis teszt és Dunn posz-hoc teszttel igazoltuk. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

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 (22. ábra).

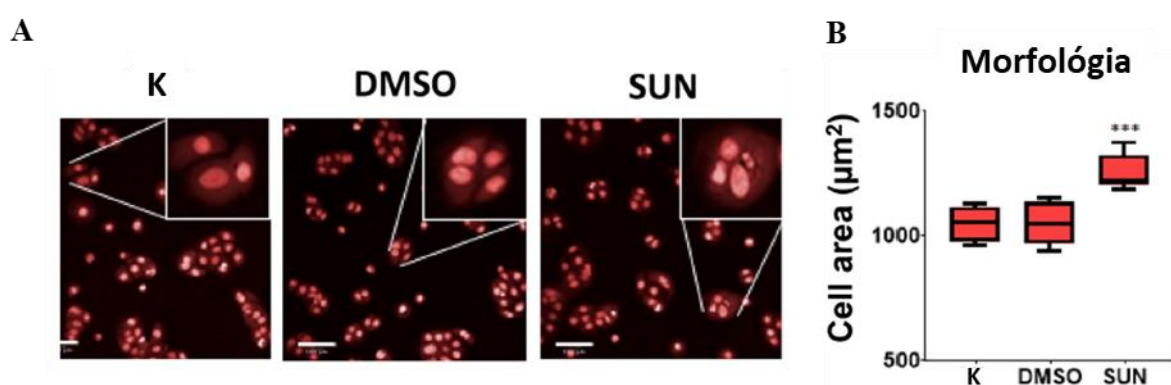


22. ábra Az NK sejtek sunitinib előkezelése csökkenti az ADCC mértékét

A kalcein-festett JIMT-1, valamint a jelöletlen NK sejteket 10 μ M sunitinibbel inkubáltuk 4 órán át, majd mosási lépéssel eltávolítottuk a közegből és elindítottuk az ADCC-t trastuzumab jelenlétében (10 μ g/ml). Az élő JIMT-1 sejtek számát HCS fluoreszcens mikroszkóppal határoztuk meg. A statisztikai elemzést 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszttel számoltuk ki. *** $p < 0,001$

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

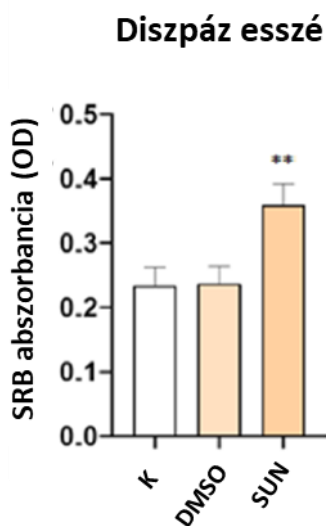
Miután az adhéziós szignalizáció befolyásolhatja a sejthalál folyamatok szabályozását, felmerül, hogy a sunitinib ennek révén is beavatkozhat az ADCC reakcióba. Ezért a sunitinibbel kezelt JIMT-1 sejteket Draq5 fluoreszcens festékkel jelöltük, majd HCS mikroszkóppal vizsgáltuk a morfológiai elváltozást. 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 ^{82,83}. Méréseink rávilágítottak arra, hogy a sunitinib szignifikáns sejtméret növekedést indukál (23. ábra).



23. ábra Sunitinib hatása a JIMT-1 sejtek morfológiájára

Sunitinib kezelést (20 μM , 1 óra, majd 10 μM , 3 óra) követően a JIMT-1 sejteket DRAQ5 fluoreszcens festékkel (5 μM , 30 perc) tettük láthatóvá a HCS mikroszkóp számára. **(A)** A felvételeket 20x objektívvel nem-konfokális üzemmódban rögzítettük. A skála 100 μm -t mutat. **(B)** A diagram 3 független kísérlet mediánját ábrázolja ($\pm\text{SEM}$). A statisztikai elemzéshez 1-utas ANOVA-t és Sidak tesztet használtunk. *** $p < 0,001$

Továbbá megvizsgáltuk, hogy a hogyan változik a ADCC target sejteinek adhéziója sunitinib kezelés hatására, amelynek eredményét a **24. ábra** szemlélteti. 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.

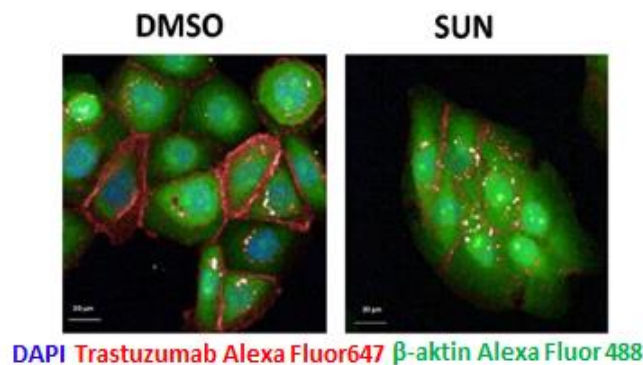


24. ábra Sunitinib kezelés fokozza a JIMT-1 sejtek adhézióját

A JIMT-1 sejteket a sunitinib (10 μ M) kezelést követően diszpáz enzimmal inkubáltuk, majd minden kezelési csoportot ötszörös ismétlésszámmal 200 μ l-es pipettaheggyel felszuszpendáltuk, majd lefixáltuk SRB esszéire. A diagram az optikai denzitási értékek átlagát ábrázolja ($\pm$ SEM). A statisztikai kiértékelés 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszt együttesével történt.

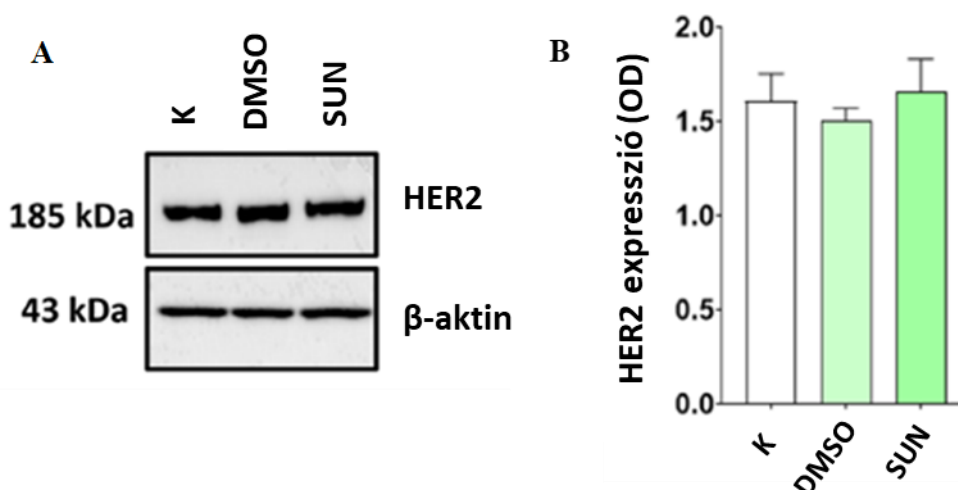
7.10 A sunitinib kezelés csökkenti a sejtfelszíni HER-2 kifejeződését

A trastuzumab-függő NK sejt ADCC célmolekulája a HER2 sejtfelszíni receptor. Ebből következik, hogy a HER2 sejtfelszíni denzitása nagymértékben befolyásolja az ADCC hatékonyság mértékét. Mivel ismert a receptor recirkuláció jelensége^{84,85,86,87,88}, 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 (**25. ábra**). Ugyanakkor Western blot-tal igazoltuk, hogy a sunitinib-nek nincs hatása a totál HER-2 expresszióra (**26. ábra**).



25. ábra Sunitinib csökkentette a sejtfelszíni HER2 kifejeződést

A JIMT-1 sejtek kezelése és egyben festése Alexa Fluor 647 fluorofórral konjugált trastuzumab antitesttel történt (piros). A sejtek formalinos fixálása után a sejtmagot DAPI-val (kék), míg a sejtek kontúráját anti-β-aktin Alexa Fluor 488 (zöld) ellenanyaggal jelöltük. A felvételeket HCS fluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük (20x száraz objektív, nem-konfokális mód).

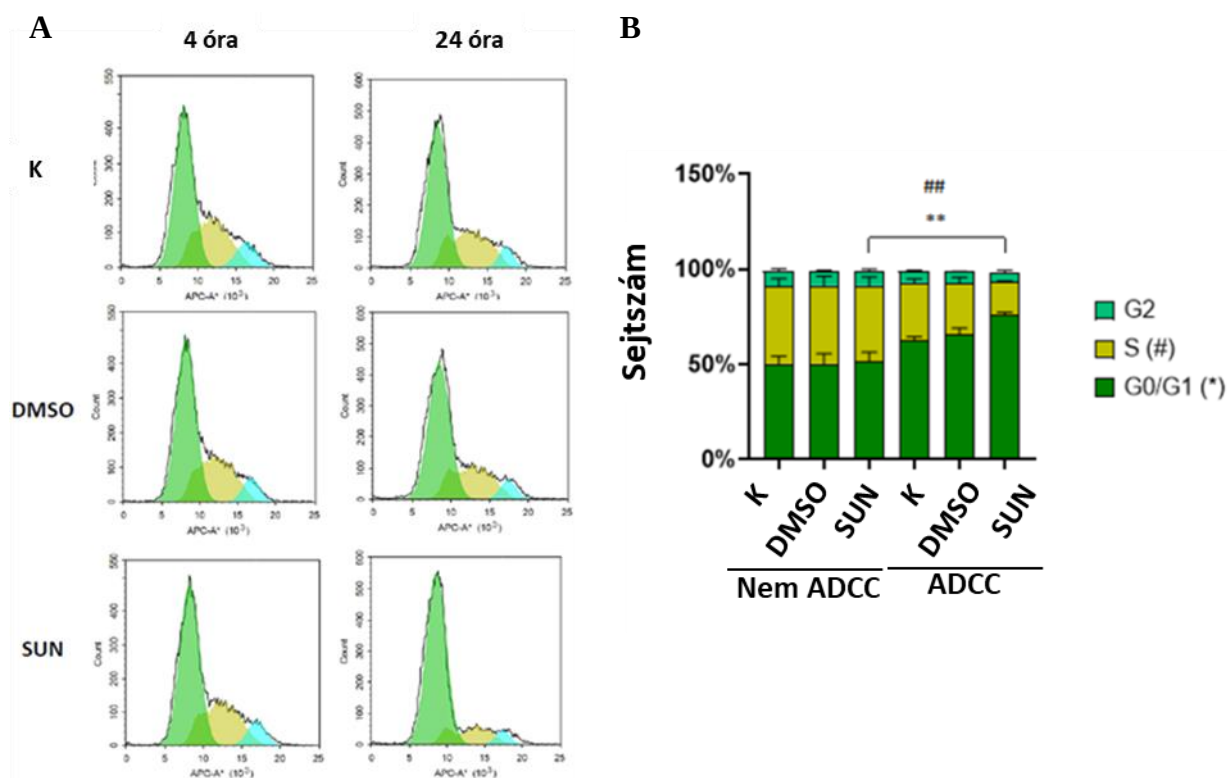


26. ábra A sunitinib nincs hatással a HER2 génexpressziójára

A JIMT-1 sejtek sunitinib-tartalmú médiumban való inkubálása (4 óra) után, a sejteket Western blot-ra gyűjtöttük össze, majd a HER2 fehérje szintjét vizsgáltuk. (A) A kísérlet során loading kontrollként a β-aktin proteint (43 kDa) használtuk. Az ECL technikával vizualizált HER2 fehérje mennyisége nem változott a kezelés hatására. (B) A denzitometráltást image J szoftver segítségével végeztük. A statisztikai elemzéshez 1-utas ANOVA-t és Sidak poszt-hoc tesztet alkalmaztunk.

7.11 A sunitinib gátolja a sejtciklust

A HER2 az epidermális növekedési faktor receptorcsalád tagja, amely a sejtosztódást irányító jelátviteli útvonal első résztvevője ⁵⁶. 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 sejtciklusban. A sunitinib kezelést követően, a JIMT-1 sejtek DNS mennyiségét RNáz A enzimmel, 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 fázisban lévő tumorsejtek számát (4 óra sun – 24 óra sun) (27. ábra).

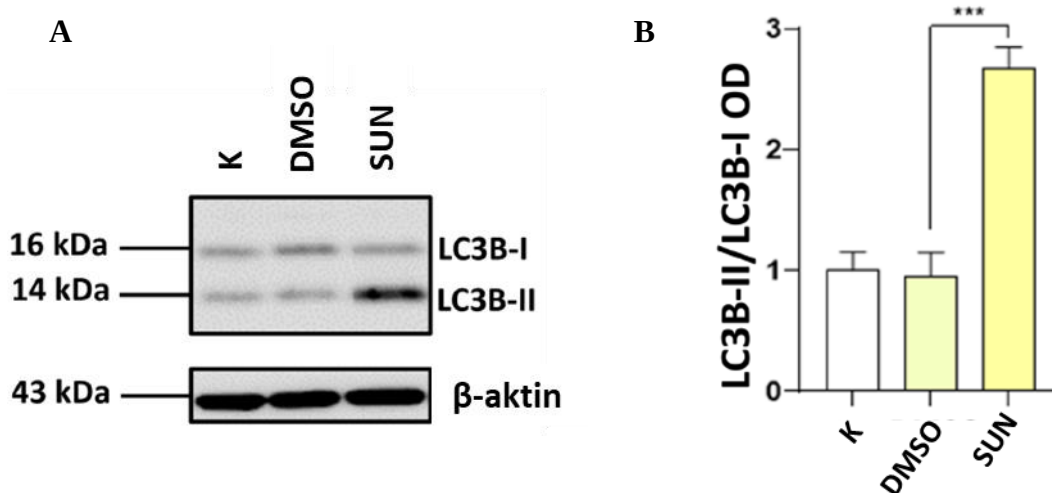


27. ábra A sunitinib a sejtciklus G0/G1 fázisában tartja a JIMT-1 sejteket

(A) A JIMT-1 sejtek sunitinib gyógyszerhatóanyaggal történő kezelése (4 vagy 24 óra) után, RNáz A enzimmel inkubáltuk, majd DRAQ5 festékkel jelöltük a DNS állományt és áramlási citométerrel vizsgáltuk a sejtciklust. (B) A sejtciklus kvantitatív elemzése. A diagramok 3 független kísérlet átlagát mutatják ($\pm$ SEM). A statisztikai kiértékelés 2-utas ANOVA és Tukey tesztel történt. $**p < 0,01$

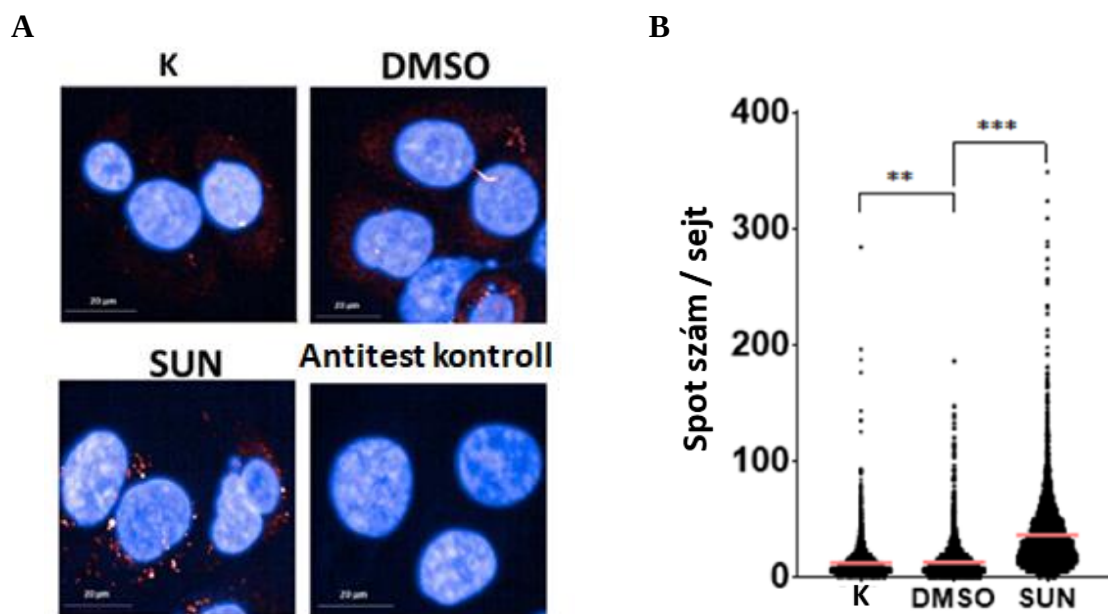
7.12 A sunitinib autofágiát indukál a JIMT-1 sejtekben

Irodalmi adatokból ismert, hogy az autofágia fokozódása egy lehetséges menekülési útvonal az NK sejt-mediált sejtlízis elől⁸⁹. Az ADCC során ugyanis az immunológiai szinapszisba ürülő természetes ölüsejt-eredetű granzim b a target sejten belül az autofagoszomákba kerülve degradálódhat^{90,91,92,93}. 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 autofagoszomák felszínén foglal helyet. Az LC3B-II markert western blot technikával vizsgáltuk és megfigyeltük, hogy sunitinib-kezelt sejtekben megemelkedett az LC3B-II mennyisége (**28. ábra**). Az autofagoszomákat 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 (**29. ábra**).



28. ábra A sunitinib autofágiát indukál a JIMT-1 sejtekben

A JIMT-1 sejteket 4 órán keresztül tartottuk sunitinib-tartalmú médiumban (1 óra, 20 μ M; 3 óra 10 μ M), majd Western blottal tanulmányoztuk a kezelés hatására bekövetkező LC3B-I és-II fehérje mennyiségét. A kísérlet során β -aktin fehérje alapján bizonyosodtunk meg arról, hogy azonos mennyiségű fehérjét vittünk fel a gélre. **(A)** Az ECL technikával vizualizált membránon jól kivehető a kezelés által indukált LC3B konverzió. **(B)** A diagram a sávok denzitometriás analízisének eredményeit ábrázolja. A statisztikai elemzéshez 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc teszt kombinációját használtuk.



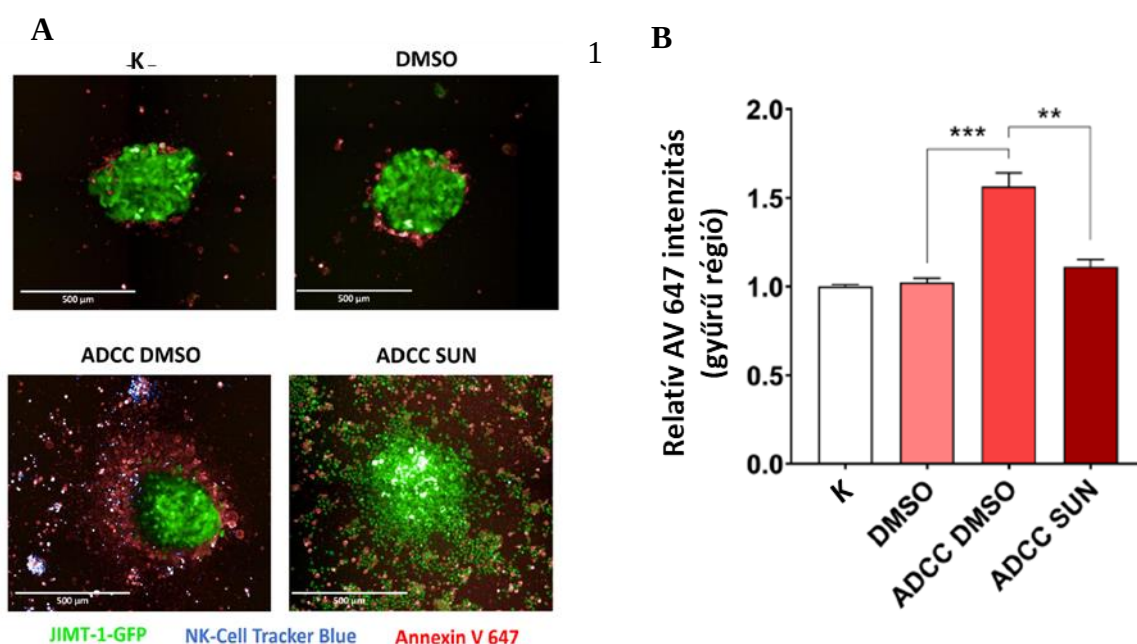
29. ábra Az immuncitokémiai vizsgálat kimutatta a megemelkedett LC3B fehérje expressziót sunitinib kezelés következtében

(A) A JIMT-1 sejtek sunitinib-kezelése után a sejteket fixáltuk, majd anti-LC3B antitesttel inkubáltuk és Opera Phenix mikroszkóppal végeztük a leképezést (40x víz immerziós objektív, konfokális mód).

(B) A szórás diagram 3 független kísérlet sejtenkénti LC3B spot számát mutatja ($\pm$ SEM). Legalább 3682 adatpont volt felhasználva a statisztikai elemzéshez, amelyet Kruskal-Wallis teszt és Dunn-poszt hoc teszttel végeztünk. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

7.13 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. Hasonlóan a 2D kultúrához, az NK sejtek a szferoidokat alkotó JIMT-1 sejtek apoptózisát eredményezte. 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 (30. ábra).

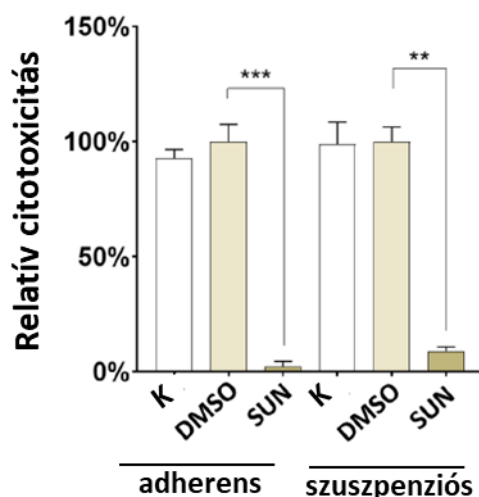


30. ábra A sunitinib gátolja a JIMT-1 sejtek apoptózisát *in vitro* 3D ADCC modellben

JIMT-1 – EGFP sejtek (zöld) felhasználásával generáltunk szferoidokat. Az ADCC kísérlethez trastuzumab (10 μg/ml) és cell tracker blue fluoreszcens festékkel-jelölt NK sejteket (kék) (E:T = 20:1) használtunk. A 24 órás sunitinibbel való inkubálás után a ko-kultúrát Annexin V 647 (piros) festékkel festettük (1 óra, 37 °C). A mikroszkopizálás HCS készülékkel történt (10x száraz objektív, konfokális mód). **(A)** Reprezentatív felvételek az ADCC reakcióról. A skála 500 μm-t jelöl. **(B)** Az oszlopok a szferoid körül megjelenő apoptotikus gyűrűben mérhető Annexin V 647 fluoreszcencia intenzitását mutatja (4 független kísérlet ±SEM). A statisztikai elemzés kiszámításához Kruskal-Wallis és Dunn-poszt-hoc tesztet használtunk. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

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^{94,95,96}. Ezen adatokból kiindulva, kíváncsiak voltunk arra, hogy az adhézión szignifikáció gátlása megszünteti-e a sunitinib- okozta rezisztenciát az ADCC reakcióval szemben. A sejttenyésztő 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 (31. ábra).

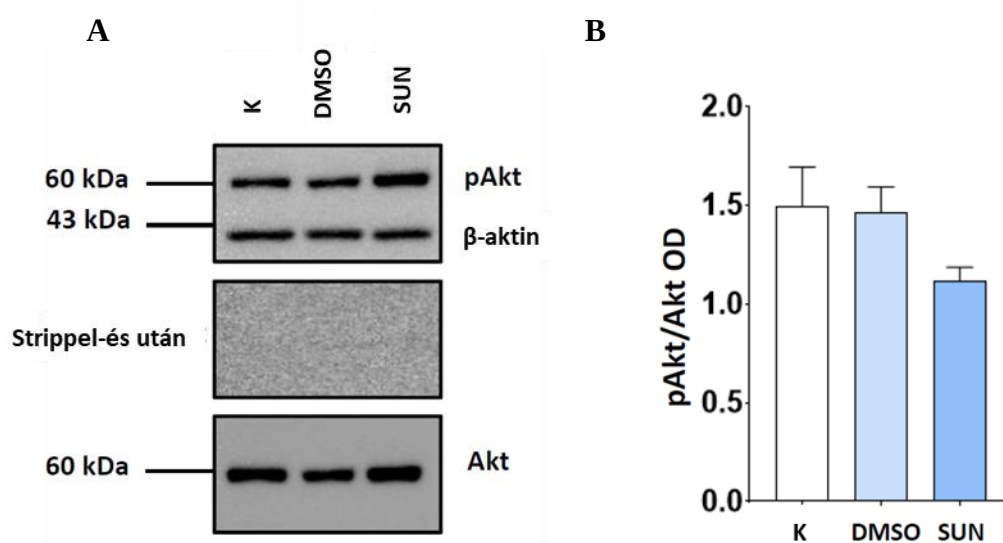


31. ábra Sunitinib ADCC-t blokkoló hatása egyaránt megfigyelhető szuszpenziós ko-kultúra esetén is

A 96-lyukú plate egyik felén a lyukak felszínét Pluronic F-127 oldattal (0,5 %; 45 perc) vontuk be, hogy meggátoljuk a sejtek adhézióját. Másnap a sejtek sunitinib-es előkezelése után (20 μ M, 1 óra), elindítottuk az ADCC reakciót az NK sejtek és trastuzumab antitest hozzáadásával (E:T = 2:1, 10 μ g/ml Tr), majd LDH esszével határoztuk meg a sejthalál mértékét. A diagram a citotoxicitás mértékét 3 független kísérlet átlagaként tünteti fel ($\pm$ SEM). Az adatok közötti szignifikanciát Kruskal-Wallis teszt és Dunn poszt-hoc teszt segítségével vizsgáltuk. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

7.14 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 ⁹⁷. Ugyanakkor azt is tudjuk, hogy az Akt fehérje az integrinek által elindított jelátviteli folyamatok centrális regulátora is ⁹⁸. A fehérje aktivációjára annak foszforilált formájának megjelenése utal, amit Western blot módszerrel vizsgáltunk. Eredményeink bizonyították, hogy a sunitinib kezelés nincs hatással az Akt foszforilációra (**32. ábra**).



32. ábra A sunitinib nem indukálja az Akt aktivációját

A sunitinib-kezelt JIMT-1 sejtek Akt és foszfo-Akt mennyiségét Western blot-tal vizsgáltuk. A kísérlet során 20 µg fehérjét vittünk fel a gélre és vizsgált mennyiségek azonosságához a β-aktin fehérjét alkalmaztuk. **(A)** Az ECL-alapú detektálás során először a pAkt formát vizualizáltuk, majd az anti-pAkt ellenanyagokat strippeléssel távolítottuk el, és a membránt anti-Akt antitesttel inkubáltuk. **(B)** A megjelenő sávok intenzitását denzitometrálással számszerűsítettük, majd Image J szoftverrel értékeltük. Az oszlopok 3 független kísérlet átlagát mutatják (±SEM). A statisztikai elemzést 1-utas ANOVA és Sidak poszt-hoc tesztel végeztük.

8 Megbeszélés

Az NK sejtek a veleszületett immunrendszer tagjaiként a tumoros és a vírus-fertőzött sejtjeink eliminálására evolválódott citotoxikus limfociták^{99,100,65}. Az NK sejtek számos aktiváló receptort hordoznak a felszínükön, ilyen például az NKG2D, DNAM-1 vagy a CD16 (IgG Fc receptor), valamint az adhéziós receptorokat, mint az integrin LFA-1. Ezen immunsejtek toleranciáját a gátló receptorok általi „saját szignál”, vagyis a fő hisztokompatibilitási komplex I (MHC-I) felismerése váltja ki^{99,100}. Az NK sejtek válaszreakciója az aktiváló, illetve a gátló receptorok felől érkező impulzusok eredőjéből következik^{99,100}. Amennyiben a mérleg nyelve a citotoxikus funkció bekapcsolása irányába billen, a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció megemelkedik, valamint a mikrotubulus organizáló centrum (MTOC) a targetsejt irányába szerveződik, majd a citotoxikus granulumok – perforin és granzim tartalma – az MTOC mentén elvándorolnak a preszinaptikus membránhoz és fuzionálva azzal, végül az immunológiai szinapszisba ürítik tartalmukat és a célsejt apoptózisát indukálják^{99,70,101}. Kísérletes munkám során az NK sejtek által közvetített ADCC reakciót a JIMT-1 sejtek trastuzumab (anti-HER2 antitest) ellenanyag általi opszonizálása tette lehetővé. Az antitest molekula a célsejt felszínén kifejeződő HER2 receptorhoz annak Fab régióján keresztül kapcsolódik, míg a trastuzumab Fc régióját az NK sejtek CD16 (FcγRIIIA) receptora ismeri fel, ezáltal hidat alakítva ki a target és effektor sejtek között. Az így kialakuló immunológiai szinapszisba exocitózissal kijutó perforin és granzim molekulák a JIMT-1 sejtek apoptotikus pusztulását eredményezik, még abban az esetben is, ha a daganat ellenálló a trastuzumabbal szembeni *in vivo* kezelésre¹⁰². Az NK sejtek daganatterápiában történő klinikai felhasználásának ötlete már az 1980-as években felmerült, amelynek finomítása még a mai napig tart¹⁰³. Az NK sejtek általi ADCC hatékonyság fokozása nagy jelentőséggel bírhat a különféle daganatos megbetegedések kezelésében⁷⁰. Továbbá a kemoterápiás szerek daganatellenes immunválaszra gyakorolt hatásának megértése segítheti a potenciális antagonisták hatásainak elkerülését.

HCS modellünk alkalmasnak bizonyult *in vitro* ADCC hatékonyságot moduláló gyógyszerhatóanyagok kiszűrésére. Az általunk tesztelt FDA molekulakönyvtár hatóanyagai közül négy molekula csökkentette az NK sejtek által közvetített citotoxikus folyamatot, amely a JIMT-1 sejtek menekülését eredményezte az ADCC elől. A vinkriszitin, a kolkicin, illetve a podofilotoxin egyaránt mikrotubulus destabilizáló vegyület⁷⁵. Az NK-sejtek aktiválódása után az első lépések egyike a lítikus granulumok konvergenciája, azaz azok gyors áthelyeződése a mikrotubulus-szervező központ (MTOC) felé. Ezt követően az MTOC és a konvergált lítikus

granulumok az NK- és a tumorsejtek érintkezési pontja, az úgynevezett immunológiai szinapszis felé polarizálódnak. A lítikus enzimet tartalmazó granulumok ezután az immunológiai szinapszisba ürülnek, ami a tumorsejtek pusztulását okozza^{99,70,101}. Ezen gátlószerek egyöntetűen a tubulin monomerekhez kötődve blokkolják mikrotubulussá történő polimerizációjukat, ezzel megakadályozva azon hálózat kialakulását, amely az NK sejtek citotoxikus mediátorainak intracelluláris mozgásában, illetve felszabadításában vesz részt^{75,104}. Ezen irodalmi adatokat figyelembe véve kísérletsorozatunk további lépésében a sunitinib több célpontú tirozin-kináz inhibitor (pl. VEGFR-1-3; PDGFR- α és - β ; FMS-sszerű tirozin-kináz 3) tanulmányozására összpontosítottunk. A sunitinib széles körben alkalmazott gyógyszer hatóanyag veserákok (renal cell carcinoma, RCC) kezelésére¹⁰⁵. A lapatinib a sunitinib-hez hasonlóan FDA által jóváhagyott receptor tirozin kináz inhibitor (EGFR és HER2 RTKI). Azonban a lapatinibnek ismert azon hatása, hogy a HER2 akkumulációt vált ki az ADCC célsejtjén, amelynek következtében nagyon eredményes trastuzumab-függő ADCC reakciót írtak le^{106,107,108}. Így viszont eredményeink ellentmondanak az irodalomban olvasottaknak az RTK gátlószerek ADCC-re gyakorolt hatását illetően. Ennek oka, hogy az irodalmi adatok 48 órán át tartó kezelés eredményei, szemben a mi kísérleteinkkel, ahol csupán 4 óráig volt a sunitinib RTK gátló a sejteken. Belátható, hogy a nagy inkubációs időbeli eltérés miatt nem feltétlenül korrelálható egymással a két jelenség, ugyanis 48 óra alatt jóval több élettani jelenség történik (pl. génexpresszió), mint 4 óra alatt.

Számos technika áll rendelkezésre, ha ADCC hatékonyságának meghatározására. Választhatunk a klasszikus radioaktív króm felszabadulási tesztől, a citoplazmatikus enzimfelszabadulási próbákon át fluoreszcencia-alapú mérésekig (áramlási citometria, mikroszkópos) sok lehetőség közül⁹¹. Ezeknek viszont közös limitációja, hogy nem alkalmasak nagy áteresztőképességű vizsgálatokhoz. Kifejlesztettünk egy képalapú HCS-essztét, amely használható vegyületkönyvtárak szűrésére ADCC-módosító gyógyszerhatóanyagok azonosítására. Azonban a festés miatt szükség van egy mosási lépésre is. természetesen, mint minden módszernek, ennek a technikának is megvannak a hátrányai. Mivel képelemzés alapú citotoxicitási esszéről beszélünk, így a fókuszsíkból detektálható EGFP-pozitív sejteket detektáljuk. Feltételezzük, hogy az elhalt sejtek felválásuknak köszönhetően kikerülnek a mikroszkóp látóteréből és releváns képet kapunk a sejtpusztulásról. Ez azonban azt is jelenti, hogy nem tudunk különbséget tenni az elhalt és haldokló (még nem teljesen felvált) sejtek között, vagy olyan szerrel dolgozunk, ami fokozza a sejtek adhézióját úgy, mint pl. a sunitinib. Ezenkívül számolnunk kell annak lehetőségével is, hogy a fluoreszcens jelölés interferál a hatóanyaggal, amely jelenséggel találkoztunk a szintén a sunitinib és kalcein esetén is. A

szűréssel kapott „hit”-ek hatását többféle technikával szükséges megerősíteni. Esetünkben megbízhatónak tekinthetjük méréseinket, hiszen pozitív kontrollként olyan hatóanyagokat (kolhicin, podofillotoxin, vinkrisztin) vontunk be kísérleteinkbe, amelyek igazoltan negatív hatással vannak az ADCC-re.

A kalcein-festett JIMT-1 sejtek sejtszámbeli elemzése rávilágított a sunitinib koncentráció-függő ADCC-t gátló hatására. A mechanizmus tanulmányozása során a kultúra mellett megvizsgáltuk a sunitinib hatását külön a JIMT-1 target sejteken és külön az effektor NK sejteken is. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az ADCC hatékonyság markáns csökkenése mögötti mechanizmus igen összetett, azaz több ponton bénítja az immunológiai reakciót. Igazoltuk, hogy a sunitinib negatív hatással bír az NK sejtek aktivációjára és ebből kifolyólag citotoxikus funkciójára. A granzim B csökkenése a sunitinib-kezelt célsejtekben az enzimnek az NK sejtől a célpontba történő szállításának károsodására utal. A sunitinib kezelést követően megfigyelhető csökkent mértékű granzim B exocitózis valószínűleg magyarázható az NK sejten belüli „trafficking” megbénításával. A gátolt granzim B felszabadulás magyarázható az NK sejtek aktiválódásában tapasztalt szuppresszióval, amelynek hátterében a sunitinibbal kezelt NK-sejtek csökkent IFN γ -termelődése állhat. A pontos mechanizmus, amellyel a sunitinib károsítja a NK-sejtek működését az ADCC-ben, további vizsgálatokat igényel.

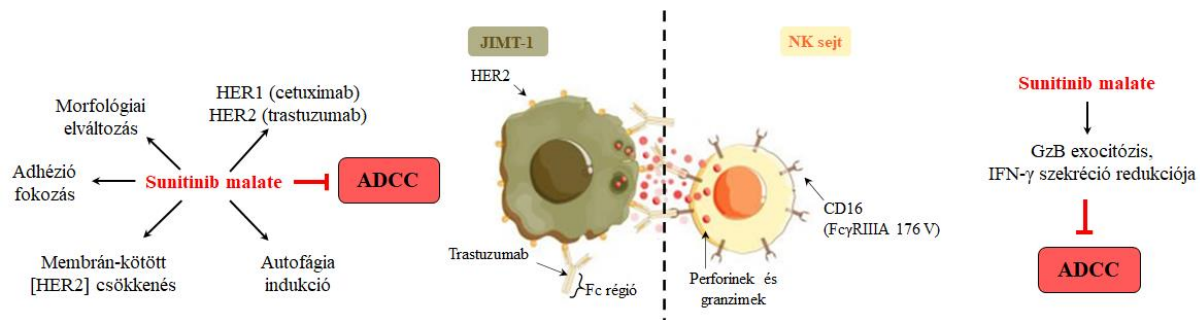
A JIMT-1 sejtek kezelése egyedi kultúrában – azaz nem ADCC rendszerben – morfológiai változást idézett elő, mivel a sunitinib-kezelés szignifikánsan megnövelte a sejtek területét a kontroll sejtekhez képest. Feltételeztük, hogy a JIMT-1 sejtek szubsztráthoz történő tapadásának megváltozása hozzájárulhat az ADCC-vel szembeni rezisztenciához. A diszpáz emésztéssel kombinált SRB esszé adatai kimutatták a sunitinib-kezelt JIMT-1 sejtek erősebb adhézióját a tenyésztőlemez felületéhez. A legvalószínűbb mechanizmus az integrinek fokozott expressziója lehet. Ismert ugyanis, hogy az adhéziós molekulákon keresztül történő jelátvitel eredményezheti a sejtek különböző citotoxikus szerekekkel szembeni rezisztenciáját ¹¹⁰. Munkacsoportunk korábban igazolta, hogy az oxidatív stressz által kiváltott partanatosz vagy a sejtsűrűség-függő jelátvitel a PARP1 gátlásához vezet, amely a partanatosz, mint programozott nekrotikus sejthalál forma központi szabályozó molekulája kapcsolatba hozható az oxidatív stresszel szembeni ellenállással ^{94,111}. Az integrin jelátvitel központi molekulája az Akt túlélési kináz, amely az adherens sejtek apoptózis rezisztenciájával van kapcsolatban ^{116,127}. Az epitél sejtek adhéziótól való függőségét mi sem bizonyítja jobban, mint az anoikisz sejthalál forma létezése. Az anoikisz ugyanis nem más, mint a programozott sejthalál egyik formája, amely az adherens sejtek esetén akkor következik be, amikor azok leválnak a környező extracelluláris

mátrixról (ECM) ¹¹². Azonban az integrin jelátvitel szerepe a sunitinib-kezelt JIMT-1 sejtek ADCC rezisztenciájához további vizsgálatokat igényel. Az Akt foszforiláció, azaz aktivációjának hiánya, illetve a tapadó és nem tapadó JIMT-1 sejtek ADCC szenzitivitás közötti különbség hiánya azonban arra utal, hogy az integrin jelátvitel valószínűleg nem jelenti a sunitinib által kiváltott rezisztencia központi mechanizmusát a modellünkben. Megjegyzendő, hogy a sunitinibbel kezelt sejteknél tapasztalt megváltozott sejtmorfológia epiteliális-mesenchimális átmenetre (EMT) is utalhat. A vesekarcinóma sejtekben a sunitinib EMT-t indukál, amelyet az EGFR aktiválásán keresztül a sunitinib rezisztenciával hoztak összefüggésbe ¹⁰⁵. Bár kísérletesen nem vizsgáltuk ezt a lehetőséget a modellünkben, nem zárható ki, hogy a sunitinib által kiváltott ADCC rezisztencia részben az EMT-indukciónak köszönhető.

A másik útvonal, amely a sunitinib védőhatásának hátterében állhat, az autofágia indukciója lehet. Az autofágia egy olyan intracelluláris újrahasznosítási útvonal, amelyet elsősorban a tápanyagszegény környezet vált ki, amikor a sejt éhezik ¹¹³. Ezért, hogy elkerülje a pusztulást, elkezd fogyasztani saját magát, elsősorban fehérjéinek és lipidjeinek mobilizálásával ¹¹³. Azonban az autofágia ennél összetettebb és a sejt homeosztázis központi útvonalának tekinthető. Ugyanis nemcsak a tápanyagszegény környezet indítja el az autofágia folyamatát, hanem a sérült vagy nem funkcionális organelumok vagy sejtkomponensek felhalmozódása is. Bár az autofágia vezethet sejthalálhoz (autofagikus sejthalál ¹¹⁴), az esetek túlnyomó részében citoprotektív mechanizmusként működik. Az autofágia blokkolását a rákos sejtek ellenállóképességének leküzdésére javasolták ¹¹⁵. Preklinikai modellekben a HER2 által indukált autofágia hozzájárult a HER2+ emlőráksejtek trastuzumab rezisztenciájához ¹¹⁶. Ezért javasolták, hogy az autofágia gátlása fokozhatja a HER2+ emlőrák trastuzumabbal szembeni érzékenységét ^{115, 116}. Annak ellenére, hogy a JIMT-1 sejtek fokozottan HER2-t expresszálnak, mégis rezisztensek a trastuzumab kezeléssel szemben ¹¹⁷, míg szenzitívek a trastuzumab által közvetített ADCC-re ¹⁰². Jelenlegi adataink arra utalnak, hogy az autofágia szintén elnyomhatja a JIMT-1 sejtek ADCC-vel szembeni érzékenységét, és így az autofágia indukciója hozzájárulhat a sunitinib deszenzitizáló hatásához. Baginska és munkatársai kimutatták, hogy az autofágia fontos szerepet tölt be az NK sejtek által közvetített veleszületett immunválaszokban. Leírták ugyanis, hogy *in vitro* körülmények között emlődaganatos sejtekben a hipoxia rontotta az NK sejtek általi citotoxicitást autofágia aktivációján keresztül. Az NK sejtek ugyan képesek voltak felismerni a rákos sejteket, azonban a limfocita-eredetű granzim B a hipoxiás célsejt autofagoszómáiban degradálódott. Így belátható, hogy az apoptózisért felelős molekula eliminálásával a daganatos sejt megmenekül végzetes sorsa elől.

Ugyanakkor az autofágia beclin1 molekula gátlása következtében a granzim B által indukált apoptózis detektálhatóvá vált mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben ⁹³.

Az ADCC hatékonyság egyik alappillére a reakcióban részt vevő antitest epitópjának jelenléte a célsejten. Ez esetünkben a JIMT-1 sejtek HER2 receptorának extracelluláris doménjének egy apró részlete. A JIMT-1-re jellemző HER2 overexpresszió révén a sejt kiváló célpontjává válik a trastuzumab-által közvetített ADCC reakciónak. Azonban belátható, hogy amennyiben a HER2 receptorsűrűség csökken, az maga után vonja az antitest-függő sejtes citotoxicitás hatékonyságának drasztikus csökkenését is. A JIMT-1 sejtek sunitinib-bel történő inkubációja után a mikroszkópos felvételek alapján kijelenthetjük, hogy a sejtfelszíni HER2 expresszió lecsökkent a kontroll sejtekhez képest. Irodalmi adatokból ismert, hogy a trastuzumab által kiváltott HER2 “downregulációja” transzkripciós szinten valósul meg, nem pedig a receptor degradációján keresztül. A daganatsejtek STAT1 aktivációja az immunsejt-eredetű IFN- γ produkciójának következménye, amely fontos szerepet tölt be a HER2 sejtfelszíni kifejeződésében trastuzumab kezelést követően ¹¹⁸. A western blot kísérletek rávilágítottak arra, hogy a sunitinib kezelés hatására nem történik változás a HER2 mennyiségében fehérje szinten, ami nem meglepő, hiszen a rövid inkubációs idő (4 óra) alatt nem várható ilyen léptékű sejtszintű válaszreakció. Így felmerül a HER2 membrán targetingjének sunitinib általi gátlása. Az ErbB család más tagjaitól eltérően a HER2 ellenáll az internalizációnak és a degradációnak, így a sejtfelszínen marad. Bár a HER2 sejtfelszínen tartásának hátterében álló mechanizmusok nem teljesen ismertek, korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az internalizáció elkerülése érdekében a HER2-nek kölcsönhatásba kell lépnie a HSP90 nevű dajkafehérjével – chaperonnal – és a PMCA2 nevű kalcium-pumpával a sejtfelszínből kiemelkedő specifikus plazmamembrán-doménokban ¹⁰⁶. Az, hogy a sunitinib hogyan zavarja meg a HER2 membránvisszatartását, további vizsgálatokat igényel.



32. ábra A sunitinib, mint ADCC inhibitor

A sunitinib ADCC gátló hatása több szinten mutatkozik meg. A cetuximab (anti-HER1)-közvetített ADCC-t ugyanúgy gátolta, mint a trastuzumab (anti-HER2) jelenlétében. A JIMT-1 sejtek méretének növekedését okozta, valamint tapadási képességére is stimuláló hatást gyakorolt. Ugyanakkor a membrán-kötött HER2 receptotok mennyisége is lecsökkent, míg a citoplazmatikus térben koncentrációja megemelkedett. Továbbá autofágia-indukcióra utaló LC3B akkumuláció is detektálható volt a sunitinibbel kezelt JIMT-1 sejtekben. A csökkent mértékű granzim B exocitózis és IFN- γ szekréció az NK sejtek funkciójára gyakorolt gátló hatására enged következtetni.

(Alamy internetes ábra nyomán: alamy.com)

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy létrehoztunk egy sejtmorfometriai mérőrendszert a trastuzumab-függő ADCC számszerűsítésére. Egy több száz komponensű vegyületkönyvtár szűrése a multicélú kináz gátló sunitinibet azonosította ADCC-szuppresszív szerként. A sunitinib ADCC-ellenes hatásának hátterében álló lehetséges mechanizmusok közé tartozik az NK-sejtek aktiválódásának gátlása és a HER2 csökkent membránvisszatartása, az autofágia indukciója és az integrin jelátvitel stimulálása a célsejtekben. Azok a kísérletek, amelyekben az NK-sejteket és a célsejteket külön-külön tettük ki a hatóanyagnak, arra utalnak, hogy az ADCC sunitinib általi elnyomása főként az NK-sejtek inaktiválásának köszönhető, és a célsejtekre gyakorolt hatások kevésbé fontosak lehetnek. A sunitinib komplex hatásainak hierarchiája további vizsgálatot igényel. Ami a vizsgálatunk klinikai jelentőségét illeti, eredményeink óvatosságra intenek a trastuzumab és a sunitinib esetleges együttes alkalmazásával kapcsolatban trastuzumab-rezisztens emlőrák esetén.

9 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 apoptózisát 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 –, és így ezen immunológiai reakciót fokozó vagy gátló gyógyszerhatóanyagot azonosítsunk.

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.

10 Summary

ADCC is one of the most prominent NK cell-mediated, trastuzumab-dependent therapy for HER2 positive breast cancer. My dissertation was based on the optimization and characterization of an *in vitro* ADCC model for screening molecular libraries. In addition, we also would have liked to better understand the mechanisms that influence ADCC.

By screening 774 FDA-approved compounds – a co-culture of unlabeled effector NK cells and calcein-stained JIMT-1 target cells – using the HCS technique, we identified four agents that resulted in a significant reduction in ADCC efficacy. However, cytotoxicity to JIMT-1 cells was observed for seven molecules. Colchicine, podophyllotoxin and vincristine sulphate known as microtubule inhibitors, which also explains the observed reduced JIMT-1 cell apoptosis. The inhibitors inhibit the formation of immunological synapses and also have a negative effect on intracellular vesicular transport processes, including exocytosis. Based on the literature, we focused on the fourth agent, which is the multi-target receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI) sunitinib. The cytoprotective effect of sunitinib on JIMT-1 cells was also demonstrated by LDH release and ECIS methods. The inhibitory effect of RTKI on ADCC was confirmed in additional HER2+ cell lines and in the presence of anti-HER1 antibody. This suggests that our observations are not limited to JIMT-1 cells or the HER2 receptor. NK cell function was assessed by their release of granzyme b and secretion of IFN- γ , and in both cases reduced activation was observed. Our experiments also highlighted a complex mechanism involving modulation of target cell phenotype, HER2 downregulation and autophagy induction. At the same time, sunitinib inhibited apoptosis of JIMT-1 cells in a 3D spheroid model and in suspension ADCC co-culture.

In an improved HCS assay for the identification of influencing ADCC agents, EGFP-transduced JIMT-1 cells were used. Our goal was to minimize human factors influencing ADCC and we automated almost all steps, including treatment and analysis steps.

In summary, we have identified the sunitinib as a new ADCC inhibitor, using a calcein staining method. The key message from our results is that FDA-approved sunitinib may interfere with trastuzumab-mediated ADCC therapy in patients with breast cancer. Moreover, we have developed an easier, faster and reliable new ADCC screening technique based on the detection of target cells that express EGFP.

11 Irodalomjegyzék

1. Janssen, D.F. Oncology: etymology of the term. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. **38** (3), 22, doi: 10.1007/s12032-021-01471-4 (2021).
2. Tabassum, D.P., Polyak, K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nature reviews. Cancer*. **15** (8), 473–483, doi: 10.1038/nrc3971 (2015).
3. Upton, J., Janeka, I., Ferraro, N. The whole is more than the sum of its parts: Aristotle, metaphysical. *The Journal of craniofacial surgery*. **25** (1), 59–63, doi: 10.1097/SCS.0000000000000369 (2014).
4. Maurovich-Horvat, P. The whole is more than the sum of its parts-Aristotle. *European heart journal. Cardiovascular Imaging*. **18** (3), 294–295, doi: 10.1093/ehjci/jew281 (2017).
5. Tysnes, B.B., Bjerkvig, R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et biophysica acta*. **1775** (2), 283–297, doi: 10.1016/j.bbcan.2007.01.001 (2007).
6. Bocchetta, M., Carbone, M. Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene*. **23** (38), 6484–6491, doi: 10.1038/sj.onc.1207855 (2004).
7. Schrenk, D. What is the meaning of “A compound is carcinogenic”? *Toxicology reports*. **5**, 504–511, doi: 10.1016/j.toxrep.2018.04.002 (2018).
8. Ayob, A.Z., Ramasamy, T.S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of biomedical science*. **25** (1), 20, doi: 10.1186/s12929-018-0426-4 (2018).
9. Anna Meiliana, Nurrani Mustika Dewi, Andi Wijaya Cancer Stem Cell Hypothesis: Implication for Cancer Prevention and Treatment. *Indonesian Biomedical Journal*. **8** (1), 21–36 (2016).
10. Patel, A. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA oncology*. **6** (9), 1488, doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2592 (2020).

11. Peters, J.M., Gonzalez, F.J. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **165** (2), 272–276, doi: 10.1093/toxsci/kfy184 (2018).
12. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*. **12** (1), 31–46, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059 (2022).
13. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144** (5), 646–674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
14. Wang, F., Du, H., Li, B., Luo, Z., Zhu, L. Unlocking phenotypic plasticity provides novel insights for immunity and personalized therapy in lung adenocarcinoma. *Frontiers in genetics*. **13**, 941567, doi: 10.3389/fgene.2022.941567 (2022).
15. Tanabe, S., Quader, S., Cabral, H., Ono, R. Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in pharmacology*. **11**, 904, doi: 10.3389/fphar.2020.00904 (2020).
16. Dong, Y., Tu, R., Liu, H., Qing, G. Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat. *Signal transduction and targeted therapy*. **5** (1), 124, doi: 10.1038/s41392-020-00235-2 (2020).
17. Wong, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. **30** (1), 87, doi: 10.1186/1756-9966-30-87 (2011).
18. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A.J., Kinzler, K.W. Cancer genome landscapes. *Science (New York, N.Y.)*. **339** (6127), 1546–1558, doi: 10.1126/science.1235122 (2013).
19. Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. The cancer genome. *Nature*. **458** (7239), 719–724, doi: 10.1038/nature07943 (2009).
20. Lee, E.Y.H.P., Muller, W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **2** (10), a003236, doi: 10.1101/cshperspect.a003236 (2010).

21. van Haaften, G. *et al.* Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nature genetics*. **41** (5), 521–523, doi: 10.1038/ng.349 (2009).
22. Shimono, Y. *et al.* Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*. **138** (3), 592–603, doi: 10.1016/j.cell.2009.07.011 (2009).
23. Saman, H., Raza, S.S., Uddin, S., Rasul, K. Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers*. **12** (5), doi: 10.3390/cancers12051172 (2020).
24. Sadrekarimi, H. *et al.* Emerging role of human microbiome in cancer development and response to therapy: special focus on intestinal microflora. *Journal of translational medicine*. **20** (1), 301, doi: 10.1186/s12967-022-03492-7 (2022).
25. Mikó, E. *et al.* Microbiome-Microbial Metabolome-Cancer Cell Interactions in Breast Cancer-Familiar, but Unexplored. *Cells*. **8** (4), doi: 10.3390/cells8040293 (2019).
26. Radosa, J.C., Stotz, L., Müller, C., Kaya, A.C., Solomayer, E.-F., Radosa, M.P. Clinical Data on Immunotherapy in Breast Cancer. *Breast care (Basel, Switzerland)*. **15** (5), 450–469, doi: 10.1159/000511788 (2020).
27. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. **27**, 16–25, doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004 (2014).
28. Gonzalez, H., Hagerling, C., Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes & development*. **32** (19–20), 1267–1284, doi: 10.1101/gad.314617.118 (2018).
29. Pandey, P.R., Saidou, J., Watabe, K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. **15** (1), 226–236, doi: 10.2741/3617 (2010).
30. Deugnier, M.-A., Teulière, J., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., Glukhova, M.A. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast cancer research : BCR*. **4** (6), 224–230, doi: 10.1186/bcr459 (2002).

31. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nature reviews. Disease primers.* **5** (1), 66, doi: 10.1038/s41572-019-0111-2 (2019).
32. Said Camilleri, J. *et al.* Review of Thermal and Physiological Properties of Human Breast Tissue. *Sensors (Basel, Switzerland).* **22** (10), doi: 10.3390/s22103894 (2022).
33. Barzaman, K. *et al.* Breast cancer immunotherapy: Current and novel approaches. *International immunopharmacology.* **98**, 107886, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107886 (2021).
34. Chia, S.K. *et al.* A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* **18** (16), 4465–4472, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0286 (2012).
35. Bastien, R.R.L. *et al.* PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC medical genomics.* **5**, 44, doi: 10.1186/1755-8794-5-44 (2012).
36. Krishnamurti, U., Silverman, J.F. HER2 in breast cancer: a review and update. *Advances in anatomic pathology.* **21** (2), 100–107, doi: 10.1097/PAP.000000000000015 (2014).
37. Waks, A.G., Winer, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* **321** (3), 288–300, doi: 10.1001/jama.2018.19323 (2019).
38. Montemurro, F., Nuzzolese, I., Ponzzone, R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? *Expert opinion on pharmacotherapy.* **21** (9), 1071–1082, doi: 10.1080/14656566.2020.1746273 (2020).
39. Price, J.M., Prabhakaran, A., West, C.M.L. Predicting tumour radiosensitivity to deliver precision radiotherapy. *Nature reviews. Clinical oncology.* **20** (2), 83–98, doi: 10.1038/s41571-022-00709-y (2023).
40. Tilsed, C.M., Fisher, S.A., Nowak, A.K., Lake, R.A., Lesterhuis, W.J. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in oncology.* **12**, 960317, doi: 10.3389/fonc.2022.960317 (2022).

41. Nathan, M.R., Schmid, P. A Review of Fulvestrant in Breast Cancer. *Oncology and therapy*. **5** (1), 17–29, doi: 10.1007/s40487-017-0046-2 (2017).
42. Hanker, A.B., Sudhan, D.R., Arteaga, C.L. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer cell*. **37** (4), 496–513, doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.009 (2020).
43. Tartakoff, A.M., Vassali, P., Détraz, M. Plasma cell immunoglobulin secretion. Arrest is accompanied by alterations the golgi complex. *The Journal of Experimental Medicine*. **146**, 1332–1345 (1977).
44. Schroeder, H.W.J., Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. **125** (2 Suppl 2), S41-52, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046 (2010).
45. Hodges, R., Heaton, R., Parker, J.M.R., Molday, L., Molday, R. Antigen-antibody interaction. Synthetic peptides define linear antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies directed to the cytoplasmic carboxyl terminus of rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*. **263**, 11768–75, doi: 10.1016/S0021-9258(18)37850-5 (1988).
46. Van Regenmortel, M.H. The concept and operational definition of protein epitopes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **323** (1217), 451–466, doi: 10.1098/rstb.1989.0023 (1989).
47. Taylor, P.C., Adams, A.C., Hufford, M.M., de la Torre, I., Winthrop, K., Gottlieb, R.L. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nature reviews. Immunology*. **21** (6), 382–393, doi: 10.1038/s41577-021-00542-x (2021).
48. Vu, T., Claret, F.X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in oncology*. **2**, 62, doi: 10.3389/fonc.2012.00062 (2012).
49. Pohlmann, P.R., Mayer, I.A., Mernaugh, R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **15** (24), 7479–7491, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0636 (2009).
50. Chames, P., Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *mAbs*. **1** (6), 539–547, doi: 10.4161/mabs.1.6.10015 (2009).

51. Liu, H. *et al.* Bispecific antibody targeting TROP2xCD3 suppresses tumor growth of triple negative breast cancer. *Journal for immunotherapy of cancer*. **9** (10), doi: 10.1136/jitc-2021-003468 (2021).
52. Lu, Y.-C., Robbins, P.F. Cancer immunotherapy targeting neoantigens. *Seminars in immunology*. **28** (1), 22–27, doi: 10.1016/j.smim.2015.11.002 (2016).
53. Lopes, A., Vandermeulen, G., Pr  at, V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. **38** (1), 146, doi: 10.1186/s13046-019-1154-7 (2019).
54. Dudley, M.E., Rosenberg, S.A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews. Cancer*. **3** (9), 666–675, doi: 10.1038/nrc1167 (2003).
55. La Gruta, N.L., Gras, S., Daley, S.R., Thomas, P.G., Rossjohn, J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nature reviews. Immunology*. **18** (7), 467–478, doi: 10.1038/s41577-018-0007-5 (2018).
56. Hudis, C.A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine*. **357** (1), 39–51, doi: 10.1056/NEJMra043186 (2007).
57. Luque-Cabal, M., García-Teijido, 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. *Clinical Medicine Insights. Oncology*. **10** (Suppl 1), 21–30, doi: 10.4137/CMO.S34537 (2016).
58. Hubbard, S.R., Miller, W.T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology*. **19** (2), 117–123, doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.010 (2007).
59. Du, Z., Lovly, C.M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular cancer*. **17** (1), 58, doi: 10.1186/s12943-018-0782-4 (2018).
60. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*. **27** (1), 1, doi: 10.1186/s12929-019-0592-z (2020).

61. Iqbal, N., Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular biology international*. **2014**, 852748, doi: 10.1155/2014/852748 (2014).
62. Zelli, V. *et al.* Circulating MicroRNAs as Prognostic and Therapeutic Biomarkers in Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of personalized medicine*. **10** (3), doi: 10.3390/jpm10030098 (2020).
63. Valabrega, G., Montemurro, F., Aglietta, M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. **18** (6), 977–984, doi: 10.1093/annonc/mdl475 (2007).
64. Wu, Y., Li, L., Zhang, D., Ma, F. Prognostic Value of the Serum HER2 Extracellular Domain Level in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*. **14** (19), doi: 10.3390/cancers14194551 (2022).
65. Lo Nigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., Merlano, M.C. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Annals of translational medicine*. **7** (5), 105, doi: 10.21037/atm.2019.01.42 (2019).
66. Krzewski, K., Strominger, J.L. The killer’s kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Current Opinion in Cell Biology*. **20** (5), 597–605, doi: 10.1016/j.ceb.2008.05.006 (2008).
67. Capitani, N., Baldari, C.T. The Immunological Synapse: An Emerging Target for Immune Evasion by Bacterial Pathogens. *Frontiers in immunology*. **13**, 943344, doi: 10.3389/fimmu.2022.943344 (2022).
68. Mody, C.H. *et al.* Microbial killing by NK cells. *Journal of leukocyte biology*. **105** (6), 1285–1296, doi: 10.1002/JLB.MR0718-298R (2019).
69. Chowdhury, D., Lieberman, J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*. **26**, 389–420, doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404 (2008).

70. Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., Trapani, J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology*. **15** (6), 388–400, doi: 10.1038/nri3839 (2015).
71. Trapani, J.A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome biology*. **2** (12), REVIEWS3014, doi: 10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014 (2001).
72. Descamps, B. [Recent data on antibody-dependent cell cytotoxicity, or the ADCC phenomenon]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. **174** (4), 741–749 (1980).
73. Vilchis-Nestor, C.A., Roldán, M.L., Leonardi, A., Navea, J.G., Padilla-Benavides, T., Shoshani, L. Ouabain Enhances Cell-Cell Adhesion Mediated by $\beta(1)$ Subunits of the Na(+),K(+)-ATPase in CHO Fibroblasts. *International journal of molecular sciences*. **20** (9), doi: 10.3390/ijms20092111 (2019).
74. Tolosa, L. *et al.* Development of a multiparametric cell-based protocol to screen and classify the hepatotoxicity potential of drugs. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **127** (1), 187–198, doi: 10.1093/toxsci/kfs083 (2012).
75. Islam, M.N., Iskander, M.N. Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*. **4** (10), 1077–1104, doi: 10.2174/1389557043402946 (2004).
76. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*. **8** (16), 3131–3141, doi: 10.7150/jca.18457 (2017).
77. Keller, S. *et al.* Effects of trastuzumab and afatinib on kinase activity in gastric cancer cell lines. *Molecular oncology*. **12** (4), 441–462, doi: 10.1002/1878-0261.12170 (2018).
78. Krzewski, K., Coligan, J.E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in immunology*. **3**, 335, doi: 10.3389/fimmu.2012.00335 (2012).
79. Smyth, M.J. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor

metastasis. *The Journal of experimental medicine*. **193** (6), 661–670, doi: 10.1084/jem.193.6.661 (2001).

80. Trapani, J.A., Smyth, M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*. **2** (10), 735–747, doi: 10.1038/nri911 (2002).
81. Cui, F., Qu, D., Sun, R., Zhang, M., Nan, K. NK cell-produced IFN- γ regulates cell growth and apoptosis of colorectal cancer by regulating IL-15. *Experimental and therapeutic medicine*. **19** (2), 1400–1406, doi: 10.3892/etm.2019.8343 (2020).
82. van Zandvoort, M.A.M.J. *et al.* Discrimination of DNA and RNA in cells by a vital fluorescent probe: lifetime imaging of SYTO13 in healthy and apoptotic cells. *Cytometry*. **47** (4), 226–235, doi: 10.1002/cyto.10076 (2002).
83. Smith, P.J., Wiltshire, M., Davies, S., Patterson, L.H., Hoy, T. A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. **229** (1–2), 131–139, doi: 10.1016/s0022-1759(99)00116-7 (1999).
84. Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., Daaka, Y. Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *The Journal of biological chemistry*. **274** (3), 1185–1188, doi: 10.1074/jbc.274.3.1185 (1999).
85. Sorkina, T., Huang, F., Beguinot, L., Sorkin, A. Effect of tyrosine kinase inhibitors on clathrin-coated pit recruitment and internalization of epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*. **277** (30), 27433–27441, doi: 10.1074/jbc.M201595200 (2002).
86. Ritchie, M., Tchistiakova, L., Scott, N. Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates. *mAbs*. **5** (1), 13–21, doi: 10.4161/mabs.22854 (2013).
87. Burke, P., Schooler, K., Wiley, H.S. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Molecular biology of the cell*. **12** (6), 1897–1910, doi: 10.1091/mbc.12.6.1897 (2001).

88. Cheng, J. *et al.* Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. *Antibodies (Basel, Switzerland)*. **9** (3), doi: 10.3390/antib9030049 (2020).
89. Viry, E. *et al.* Autophagic degradation of GZMB/granzyme B: a new mechanism of hypoxic tumor cell escape from natural killer cell-mediated lysis. *Autophagy*. **10** (1), 173–175, doi: 10.4161/auto.26924 (2014).
90. Yuan, H. *et al.* LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. **296** (2), H470-479, doi: 10.1152/ajpheart.01051.2008 (2009).
91. Zois, C.E., Koukourakis, M.I. Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autophagy*. **5** (4), 442–450, doi: 10.4161/auto.5.4.7667 (2009).
92. Bakondi, E. *et al.* Role of intracellular calcium mobilization and cell-density-dependent signaling in oxidative-stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. **121** (1), 88–95, doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12329.x (2003).
93. Baginska, J. *et al.* Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110** (43), 17450–17455, doi: 10.1073/pnas.1304790110 (2013).
94. Aoudjit, F., Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. **20** (36), 4995–5004, doi: 10.1038/sj.onc.1204554 (2001).
95. Schmidmaier, R., Baumann, P. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Current medicinal chemistry*. **15** (10), 978–990, doi: 10.2174/092986708784049667 (2008).
96. Weaver, V.M. *et al.* beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer cell*. **2** (3), 205–216, doi: 10.1016/s1535-6108(02)00125-3 (2002).

97. Rahimi, M., Talebi Kakroodi, S., Tajvidi, M. The Importance of RTK Signaling Genes and their Inhibitors in Breast Cancer. *Journal of Obstetrics, Gynecology and Cancer Research*. **7** (4), 258–271, doi: 10.30699/jogcr.7.4.258 (2022).
98. Stupack, D.G., Cheresch, D.A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *Journal of cell science*. **115** (Pt 19), 3729–3738, doi: 10.1242/jcs.00071 (2002).
99. Hsu, H.-T. *et al.* NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing. *The Journal of cell biology*. **215** (6), 875–889, doi: 10.1083/jcb.201604136 (2016).
100. Talerico, R. *et al.* NK cells control breast cancer and related cancer stem cell hematological spread. *Oncoimmunology*. **6** (3), e1284718, doi: 10.1080/2162402X.2017.1284718 (2017).
101. Eitler, J. *et al.* Inability of granule polarization by NK cells defines tumor resistance and can be overcome by CAR or ADCC mediated targeting. *Journal for immunotherapy of cancer*. **9** (1), doi: 10.1136/jitc-2020-001334 (2021).
102. Barok, M. *et al.* Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer letters*. **260** (1–2), 198–208, doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.043 (2008).
103. Fabian, K.P., Hodge, J.W. The emerging role of off-the-shelf engineered natural killer cells in targeted cancer immunotherapy. *Molecular therapy oncolytics*. **23**, 266–276, doi: 10.1016/j.omto.2021.10.001 (2021).
104. Ben-Shmuel, A., Sabag, B., Biber, G., Barda-Saad, M. The Role of the Cytoskeleton in Regulating the Natural Killer Cell Immune Response in Health and Disease: From Signaling Dynamics to Function. *Frontiers in cell and developmental biology*. **9**, 609532, doi: 10.3389/fcell.2021.609532 (2021).
105. Mizumoto, A. *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor contributes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **355** (2), 152–158, doi: 10.1124/jpet.115.226639 (2015).

106. Jeong, J., Kim, W., Kim, L.K., VanHouten, J., Wysolmerski, J.J. HER2 signaling regulates HER2 localization and membrane retention. *PloS one*. **12** (4), e0174849, doi: 10.1371/journal.pone.0174849 (2017).
107. Scaltriti, M. *et al.* Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene*. **28** (6), 803–814, doi: 10.1038/onc.2008.432 (2009).
108. Maruyama, T. *et al.* Lapatinib enhances herceptin-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by up-regulation of cell surface HER2 expression. *Anticancer Research*. **31** (9), 2999–3005 (2011).
109. Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., Facchini, A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. **8** (6), 1131–1135, doi: 10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001 (2001).
110. Ruan, Y. *et al.* Mechanisms of Cell Adhesion Molecules in Endocrine-Related Cancers: A Concise Outlook. *Frontiers in endocrinology*. **13**, 865436, doi: 10.3389/fendo.2022.865436 (2022).
111. Regdon, Z. *et al.* High-content screening identifies inhibitors of oxidative stress-induced parthanatos: cytoprotective and anti-inflammatory effects of ciclopirox. *British journal of pharmacology*. **178** (5), 1095–1113, doi: 10.1111/bph.15344 (2021).
112. Zhan, M., Zhao, H., Han, Z.C. Signalling mechanisms of anoikis. *Histology and histopathology*. **19** (3), 973–983, doi: 10.14670/HH-19.973 (2004).
113. Zamame Ramirez, J.A., Romagnoli, G.G., Kaneno, R. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy. *Life sciences*. **265**, 118745, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118745 (2021).
114. Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., Arakawa, S. Autophagic cell death and cancer. *International journal of molecular sciences*. **15** (2), 3145–3153, doi: 10.3390/ijms15023145 (2014).

115. Maycotte, P., Thorburn, A. Targeting autophagy in breast cancer. *World journal of clinical oncology*. **5** (3), 224–240, doi: 10.5306/wjco.v5.i3.224 (2014).
116. Cufí, S. *et al.* Autophagy-related gene 12 (ATG12) is a novel determinant of primary resistance to HER2-targeted therapies: utility of transcriptome analysis of the autophagy interactome to guide breast cancer treatment. *Oncotarget*. **3** (12), 1600–1614, doi: 10.18632/oncotarget.742 (2012).
117. Tanner, M. *et al.* Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. **3** (12), 1585–1592 (2004).
118. Shi, Y., Fan, X., Meng, W., Deng, H., Zhang, N., An, Z. Engagement of immune effector cells by trastuzumab induces HER2/ERBB2 downregulation in cancer cells through STAT1 activation. *Breast cancer research : BCR*. **16** (2), R33, doi: 10.1186/bcr3637 (2014).

12 Tárgyszavak

Onkológia

Tumorigenezis

Sunitinib

Természetes ölósejt

Emlődaganat

Antitest-függő sejtes citotoxicitás

ADCC

HER2

Trastuzumab

Herceptin

HCS

13 Keywords

Oncology

Tumorigenesis

Sunitinib

Natural killer cell

Breast cancer

Antibody-dependent cellular toxicity

ADCC

HER2

Trastuzumab

Herceptin

HCS

13 Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Virág Lászlónak, aki a PhD tanulmányaim alatt végig fogta a kezem. Iránymutatást adott, hogyan érdemes megközelíteni egy elméleti kérdést vagy kísérletes problémát. Számtalan alkalommal biztosított szabadkezet egy-egy elméletem kísérletes alátámasztására, annak ellenére, hogy tudta, nem azt az eredményt fogom kapni, ami előrébb vinné a kutatásunkat. Kiemelném higgadságát és magabiztosságát, amely igazán inspiráló számomra. Páratlan időbeosztási képessége is figyelemreméltó, ugyanis végeláthatatlan elfoglaltságai ellenére, mindig volt ideje egy-egy kérdés megvitatására vagy lelki vigasz nyújtására.

Köszönet illeti Dr. Hegedűs Csaba adjunktus urat, akitől a folyadékkezelő robot és a mikroszkópos felvételek készítésében, kiértékelésében vagy az általam elemzett mérések ellenőrzésében kaptam segítséget.

Külön kiemelném Dr. Demény Mátét, aki fél szemmel mindig figyelemmel kísérte munkámat és nem ritkán önszántából is a szárnyai alá vett. Közös munkánk alkalmával megtanulhattam tőle többek között az áramlási citometria magabiztos használatát.

Sokat tanultam Dr. Regdon Zsolt labortársamtól is, aki elsősorban a mikroszkopizálás rejtelmeibe vezetett be. Isotta Sturniolo PhD hallgató személyében egy életvidám, magabiztos ifjú hölgyet ismerhettem meg, akinek a 3D szferoid kísérletek elvégzését köszönhetem.

Nem mehetek el a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet munkatársai közül Prof. Dr. Szöllősi János, Prof. Dr. Vereb György, illetve Dr. Szőőr Árpád megemlézése nélkül, akik a JIMT-1 és NK sejteket biztosították számomra. Ugyanakkor meglátásaik még szofisztikáltabbá varázsolták a megfigyelt jelenségek mögött álló molekuláris mechanizmusok feltérképezését. Mindemellett Árpád ELISA kísérletei nélkül kevésbé lehetett volna színes közös közleményünk.

Említést érdemel Dr. Bakondi Edina, Dr. Kovács Katalin, Dr. Polgár Zsuzsanna, Dr. Kiss Alexandra, Dr. Kókai Endre, Hajnád Zoltán és Nagy-Pénzes Máté, akikhez szintén fordulhattam kérdéseimmel. Továbbá Tőgyi Balázs és Pöstényi Balázs a JoVE folyóiratban publikált közlemény készítése során nyújtott informatikai tudásukkal segítettek munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Janka Eszter Annának, aki a statisztikai elemzések ellenőrzését végezte.

Megemlíteném a Virág-labor azon volt/jelenlegi munkatársait, akik nélkül nem működhet gördülékenyen a kísérletes munka. Herbály Mihályné Erzsike bár ma már nagymamaként tölti nyugdíjas éveit, nem felejtetem el a kezdetekben nyújtott bátorító, olykor vigasztaló szavait

és különleges humorát. A fiatal anyuka, Olajosné Gulyás Erika mérhetetlen kedvessége is megkönnyítette mindennapjaimat. Tankáné Farkas Andrea “csupaszív” kolléganőnk nemcsak kiváló munkájával könnyítette életünket, hanem páratlan kreativitásával igazán otthonossá tette a munkakörnyezetünket. Varga Dávid fiatal munkatársunkra barátságos személyisége miatt emlékszem vissza szívesen.

Ugyanakkor az Orvosi Vegytani Intézet valamennyi dolgozójának is köszönetet mondok, akik mind a maguk területén járultak hozzá ahhoz, hogy megszerezhessem doktori fokozatomat.

Mérhetetlen hálával tartozom a családomnak, szüleimnek, különösen Édesanyámnak, aki egyedülálló szülőként – Édesapám halálát követően – továbbra is biztosította számomra, hogy mindig a legkiválóbb oktatási intézményekben tanulhassak. Talpraesettségük, intelligenciájuk és szigorúságuk azon tulajdonságaik, amelyek megnyitották számomra azokat a bizonyos ajtókat, amelyek a PhD fokozatom megszerzéséhez vezetnek.

Köszönet illeti páromat, aki szeretetével és ösztönző szavaival, mindig igyekezett elhessegetni a kétségeimet, hogy a megfelelő úton járok-e.

Végezetül köszönöm azon kevés embernek, akiket a barátaimnak mondhatok, hogy igyekeztek az élet bármely területén felmerülő nehézségek átlendítésén.

14 Publikációs lista



**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., Szőör, 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 tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.08.29.



15 Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomata.