

Zsebik Barbara
okleveles vegyész, angol-magyar szakfordító

EMLŐTUMOROK
KOMBINÁLT TERÁPIÁJÁNAK ÚJABB LEHETŐSÉGEI

Doktori értekezés

Témavezető: Dr. Vereb György

Készült a Debreceni Egyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek doktori programja keretében

Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Debrecen

2006

A Doktori Értekezés Impressziuma

EMLŐTUMOROK

KOMBINÁLT TERÁPIÁJÁNAK ÚJABB LEHETŐSÉGEI

Zsebik Barbara
okleveles vegyész, angol-magyar szakfordító

Készült a Debreceni Egyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek doktori programja keretében

Témavezető: Dr. Vereb György

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus
Tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Nyitrai Miklós, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2006.

Az értekezés bírálói:

Dr. Holló Zsolt, PhD
Dr. Kappelmayer János, az orvostudomány kandidátusa

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus
Tagok: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora
Dr. Holló Zsolt, PhD
Dr. Kappelmayer János, az orvostudomány kandidátusa
Dr. Nyitrai Miklós, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2006.

TÁRGYSZAVAK

Emlőtumor, immunterápia, trastuzumab (Herceptin), 17-AAG, ErbB2 (HER2), fotodinámiás terápia, cisztatin, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

KEY WORDS

breast tumour, immunotherapy, trastuzumab (Herceptin), 17-AAG, ErbB2 (HER2), photodynamic therapy, cystatin, vascular endothelial growth factor

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1 Az EGF receptorcsalád jelátviteli modellje, az ErbB2 dimerjeinek jelentősége	7
2.2 Az EGF-család jelátviteli folyamatát befolyásoló tényezők.....	11
2.3 Az ErbB2 receptor túlzott mértékű kifejeződése, az ErbB2-pozitív daganatok kezelésének nehézségei.....	15
2.4 A trastuzumab humán emlőtumorokra kifejtett hatása.....	18
2.5 A kis molekulatömegű inhibitorok terápiás alkalmazása: a 17-allilamino-17-dimetoxi geldanamicin.....	22
2.6 A fotodinamiás terápia (PDT)	25
2.7 Ciszteín proteináz inhibitorok (CPI).....	27
2.8 Az angiogenezis szerepe a tumorok kialakulásában	29
3. Célkitűzések.....	31
4. Anyagok és módszerek.....	32
4.1 Az kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak és állatmodellek.....	32
4.2 Alkalmazott antitestek és vegyületek.....	33
4.3 Kezelés 17-AAG-vel, trastuzumabbal, valamint a kettő kombinációjával.....	35
4.4 Az ErbB2 expresszió és foszforiláció áramlási citometriás meghatározása.....	35
4.5 Az ErbB2 homo- és heteroasszociációjának meghatározása.....	36
4.7 Apoptózis vizsgálat.....	39
4.8 A cisztatin (CPI) és a fotodinamiás terápia (PDT) kombinációja.....	40
4.9 Szöveti metszetek elemzése.....	41
4.10 Patkány szérum VEGF tartalmának meghatározása.....	42
4.11 Statisztikai elemzés	42
5. Eredmények és megbeszélés.....	43
5.1 Az SKBR-3 és a JIMT-1 sejtek ErbB2 dimerizációja és aktivációja	43
5.2 A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk hatása a sejtek proliferációjára	47
5.3 A 17-AAG dózisfüggő apoptozist és kismértékű nekrozist okoz.....	49
5.4 A sejtek proliferációjának, ErbB2 szintjének és ErbB2 foszforilációjának dózisfüggő változása 17-AAG hatására	50
5.4 A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk antiproliferatív hatása korrelál az ErbB2 számmal, valamint az ErbB2 foszforilációval.....	54
5.5 A fotodinamiás terápia (PDT) és a cisztatin (CPI) kombinációjának nekrozist előidéző hatása patkány emlőkarcinómában in vivo.....	56
5.6 Az emelt dózisu PDT és a CPI-vel kombinált PDT hatékonyan csökkenti a tumor térfogatát.....	61
5.7 A szérum VEGF szintje a PDT és a CPI kombinációjánál a legalacsonyabb.....	62
5.8 A tumor vaszkularizációjának alakulása a PS-PDT-CPI terápia alkalmazása során.....	64
6. Összefoglalás	68
7. Gyakorlati jelentőség.....	69
8. Referenciák.....	70
9. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk.....	78
A PDGF-receptor- β működése A172 glioblastóma sejteken a lipid tutajokhoz kötött.....	79
10. Köszönetnyilvánítás.....	80

1. Bevezetés

A tumorok hatékony kezelése a klinikum egyik kritikus problémája. Jelenleg számos módszer (kemo-, radio- és sebészeti terápia) áll rendelkezésre a daganatok gyógyítására, azonban önmagukban ritkán mutatnak kellő hatékonyságot, és a mellékhatások is számottevőek lehetnek.

A tirozinkináz aktivitással bíró EGF receptorcsalád egyik tagja az ErbB2 fehérje, mely az epidermális eredetű emlőtumorsejtök 30%-ában fokozott mértékben fejeződik ki a sejtek felszínén. Ez a 185 kDa tömegű molekula – a család többi tagjához (ErbB1, ErbB3 és ErbB4) hasonlóan – hajlamos a receptorcsaládhoz tartozó további fehérjékkel di-, ill. oligomereket képezni. A kölcsönhatásba került receptorok transzfoszforilálódnak, aktiválódnak, foszfortirozin oldalláncaikon jelátviteli kaszkádokat indítanak, s végeredményben a sejtek proliferációját, ill. túlélését segítik elő. Az ErbB2-t túlzott mértékben kifejező emlőtumorsejtök prognózisa kifejezetten rossz. Ugyanakkor, mivel az ErbB2 a felnőtt szervezet viszonylag kevés szövetében, és alacsony szinten fejeződik ki normális körülmények között, az ErbB2 fehérje molekuláris terápiaik kiváló célpontja.

Az első, szolid tumorok kezelésére kifejlesztett humanizált antitest is az ErbB2 ellen irányult: a trastuzumab (Herceptin) az egér eredetű 4D5 jelű antitest variábilis régiójának antigénkötő szekvenciáját tartalmazza. Bár a trastuzumab – különösen kemoterápiával (antraciklin, doxorubicin, vagy Paclitaxel) kombinálva jó klinikai eredményeket ad, gyakori a primer rezisztencia, és a kezdetben érzékeny tumorok kezelése során is sokszor megszűnik a trastuzumab hatékonysága. A rezisztencia mechanizmusa(i) részleteiben nem ismert(ek), mint ahogy szenzitív tumorok esetén a hatásmechanizmus sem, azonban feltételezhető, hogy a receptor aktiváció és internalizáció, ill. azok hiánya mindkét esetben fontos szereppel bír. A

trastuzumab-rezisztencia okainak tanulmányozása *in vitro* körülmények között mindeddig nehézkes volt, ugyanis nem állt rendelkezésre olyan tenyésztető sejtvonal, mely hordozta volna ezen sajátságot.

Nemrég azonban kollaborációs partnerünknek (Jorma Isola, Finnország) sikerült egy klinikailag trastuzumab-refrakter emlőtumoros beteg pleurális áttétjéből trastuzumab-rezisztens, *in vitro* tenyésztető sejtvonalat előállítani. Munkánk első részében ezen JIMT-1 sejtvonal, és a már ismert, trastuzumab szenzitív SKBR-3 emlőtumor sejtvonal *in vitro* összehasonlítását végeztük, a trastuzumab-rezisztencia hátterében álló molekuláris kölcsönhatásokat, valamint a Hsp90-dajkafehérje inhibitor 17-AAG (17-allilamino-17-dimetoxi-geldanamicin) lehetséges proliferációgátló szerepét vizsgálva. Ez utóbbi egy anzamicin származék, mely gátolja a receptor stabil konformációjának internalizáció utáni visszaalakulását, így elvileg potencírozhatja a trastuzumab hatását.

Az immun- és inhibitor terápián kívül a fényterápiát is nagy hatékonysággal alkalmazzák az emlődaganatok kezelésében. A fotodinámiás terápia (PDT) egy olyan fényterápiás eljárás, ahol a daganatos sejtekben felhalmozódott fotoszenzitizálót specifikus hullámhosszúság tartományban (általában vörös, ill. infravörös fényel) világítják meg. Az abszorbeált fotonoknak köszönhetően a fotoszenzitizáló molekulák gerjesztett állapotba kerülnek, ahol könnyen reakcióba lépnek oxigénnel, valamint különféle biomolekulákkal. A reakciókban képződött szinglett oxigén, illetve más szabadgyökök a daganatos sejtek pusztulását okozzák.

A fotodinámiás terápia – tekintve, hogy a fotoszenzitizáló ágens feldúsulása a daganatsejtekben nem tökéletesen szelektív – mellékhatásokat okozhat, így célszerű olyan kiegészítő kezeléseket kipróbálni, melyek a PDT-val szinergista hatásúak. Munkánk során egy patkány eredetű emlőtumort *in vivo* patkány modellben vizsgálva a fotodinámiás terápiát cisztein proteinázokat gátló (CPI) cisztatinnal kombináltuk. A tojásfehérjéből izolált cisztatin

az extracelluláris mátrix komponenseinek bontásában résztvevő katepszin B és L működését gátolja, így várhatóan a metasztázis képződés csökkentésével javítja a PDT hatását.

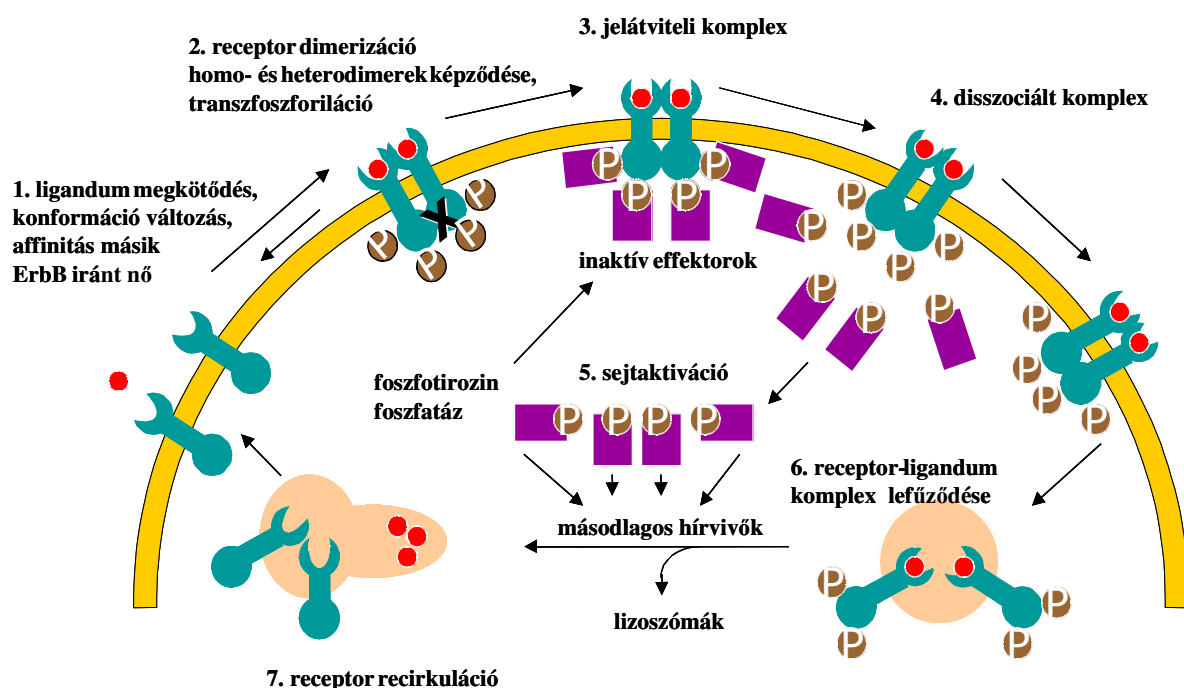
2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az EGF receptorcsalád jelátviteli modellje, az ErbB2 dimerjeinek jelentősége

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család tagjai jelentős szerepet játszanak számos jelátviteli kaszkád megindításában; különféle jelátviteli utak aktiválásával változatos sejtválaszokat váltanak ki, úgy, mint proliferáció, túlélés, adhézió, migráció és differenciáció. A növekedési faktor-indukált EGFR jelátvitel elengedhetetlen a normál morfogenetikus folyamatok lejátszódásában, ugyanakkor ismert ezen receptorcsalád tagjainak aberráns aktivitása is, ami kulcsfontosságú szerepet játszik a tumor sejtek kialakulásában és növekedésében (Yarden 2001).

A család négy tagja az EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 valamint a HER4/ErbB4 néven ismert transzmembrán receptor fehérje. Szerkezetüket tekintve két fő részből állnak, egy extracelluláris ligandum-kötő doménből, illetve egy enzimaktivitással bíró citoplazmatikus régióból (Ullrich és Schlessinger 1990). Ezen szerkezetnek köszönhetően a specifikus ligandumok bekötődése által indukált jel könnyen átjut a plazmamembránon, génexpresszió változást, illetve különböző sejtválaszokat eredményezve. A receptorokhoz kapcsolódó ligandumok közül megkülönböztethetünk EGF-szerű molekulákat, transzformáló növekedési faktor-szerű molekulákat, valamint neuregulinokat. A ligandumok a receptorok extracelluláris doménjéhez kötődve elősegítik azok homo-, illetve heterodimerjeinek képződését. Az egymáshoz kapcsolódott receptor fehérjék tirozin oldalláncai kereszt-foszforilálódnak, ezáltal biztosítva citoplazmatikus enzimek és adapter fehérjék kötődését. Az aktivált effektorok, adapter proteinek különböző jelátviteli kaszkádokat stimulálnak.

Végül, a jelátvitel elsődlegesen a receptor-ligandum komplex endocitózisán keresztül inaktíválódik (**1. ábra**). A létrejövő endoszóma tartalma a dimerek stabilitásától, illetve ubiquitin ligáz jelenlététől függően vagy degradálódik, vagy ismét a sejtfelszínre kerül (Wells 1999).

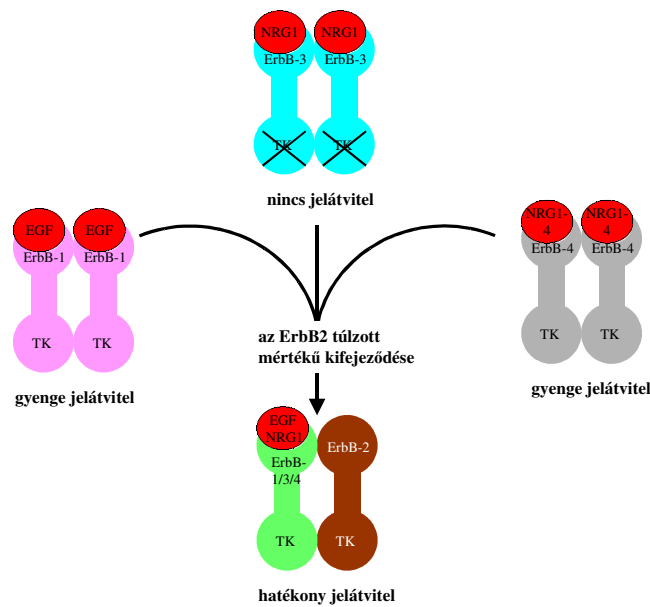


1. ábra Az EGFR-család jelátvitelt indító modellje: A receptorok extracelluláris doménjéhez kötődött ligandumok elősegítik a homo- illetve heterodimerekképződését (1-2). Az egymáshoz kapcsolódott receptorok tirozin oldalláncai kereszt-foszforilálódnak (2), ezekhez citoplazmatikus enzimek és adapter fehérjék kapcsolódnak (3). A létrejött jelátviteli komplexek disszociációját követően az aktivált effektorok és adapter proteinek szabadon diffundálnak a citoplazmában (4), és különböző jelátviteli kaszkádokat, transzkripciós regulátorokat stimulálnak (5). Végül, a receptor dimerek a jelátvitelt inaktíválva internalizációt követően degradálódnak (6) vagy ismét a sejtfelszínre kerülnek (7).

A jelátviteli folyamatokban az EGFR legfontosabb dimerizációs partnere az ErbB2 (Tzahar és mtsai. 1996), azonban számos mechanizmusnak köszönhetően ez a fehérje potenciális heterodimerizációs partnere a többi ErbB receptornak is. Az ErbB2-t először

potenciális onkogén mutánsként karcinogén-kezelt patkányok neuroglioblasztómájából izolálták (Harari és Yarden 2000). Ez a fehérje a család kivételes tagjának tekinthető, ugyanis nem rendelkezik specifikus szekretált ligandummal. Ezen tény ellenére azonban képes aktiválódni, foszforilálódni és ezáltal jelátviteli folyamatot indukálni, pl. nagy mennyiségű ErbB2 kifejeződésekor homodimereket, ill. nagyobb asszociátumokat képezve (Nagy és mtsai. 1998; Nagy és mtsai. 1999). Emellett felmerül pl. a Muc4/szialomucin transzmembrán glikoproteinnel kialakított ligandum-receptor típusú membránkött komplex aktiváló szerepe is. A Muc4/SMC egy olyan heterodimer glikoprotein, mely egy mucin (ASGP-1) és egy transzmembrán (ASGP-2) alegységből áll. Ez utóbbi két epidermális növekedési faktor domént tartalmaz, melyek közül az egyik az ErbB2 ligandumaként viselkedik (Jepson és mtsai. 2002). Az ErbB2 receptor túlzott mértékű sejtfelszíni kifejeződése elősegíti a daganatok kialakulását. Ez a túlzott mértékű kifejeződés egyes daganatok esetében, mint például a petefészek és emlődaganatok, rossz prognózissal társul.

Az ErbB jelátvitel lehetséges kimenetelét az ErbB dimerek típusa jelentősen befolyásolja. Ennek függvényében eltérő sejtválaszok jöhetnek létre, úgy, mint a tumorigenezissel társuló sejtosztódás és migráció, az adhézio, valamint a differenciáció és az apoptózis. A homodimert alkotó receptorok kombinációja kevésbé mitogén és transzformáló sajátosságú ellentétben a heterodimerekkel, melyek közül a leghatékonyabb dimereknek az ErbB2 receptorral alkotott párok számítanak (**2. ábra**) (Riese és mtsai. 1995). Az EGF-szerű ligandumok, illetve a neuregulinok kötődése az ErbB1, ErbB3 vagy ErbB4 receptorok extracelluláris doménjéhez *in vitro* homodimer képződést idéz elő, amikor viszont az ErbB2 túlzott mértékben expresszálódik a sejt felszínén, akkor a heterodimerek kialakulása a domináns.



2. ábra A homodimerek és ErbB2-tartalmú heterodimerek indukálta jelátvitel erőssége: A tirozinkináz aktivitással bíró ErbB1 és ErbB4 receptorok homodimerjei könnyen indukálnak jelátvitelt, míg a tirozinkináz aktivitással nem rendelkező ErbB3 erre önmagában nem képes. Mindhárom receptor ErbB2-vel alkotott heterodimerje azonban igen hatékony jelátvitelt indukál.

Az ErbB2 talán legfontosabb heterodimerizációs partnere a tirozinkináz aktivitás nélküli ErbB3, ezzel alkotja a legerősebb mitogénikus és transzformáló hatással bíró komplexet (Kokai és mtsai. 1989; Yarden és Sliwkowski 2001), mely neuregulin megkötésével is képes az aktiválódásra. Az ErbB2 túlzott mértékű kifejeződésének köszönhetően az ErbB2 és ErbB3 az emlődaganatok sejtfelületén nagy mitogénikus aktivitású heterodimert képezhet, s ennek aktivitását fokozhatja a Muc4/SMC jelenléte (Jepson és mtsai. 2002). Az ErbB2 tartalmú heterodimerek sokkal stabilabbak a sejtfelületen, mint az olyan dimerek, melyek az EGFR-család egyéb tagjait tartalmazzák. A stabilitásnak köszönhetően ezek a heterodimerek lényegesen hosszabb időt töltenek a membránban, mint más ErbB homodimerek (Lenferink és mtsai. 1998).

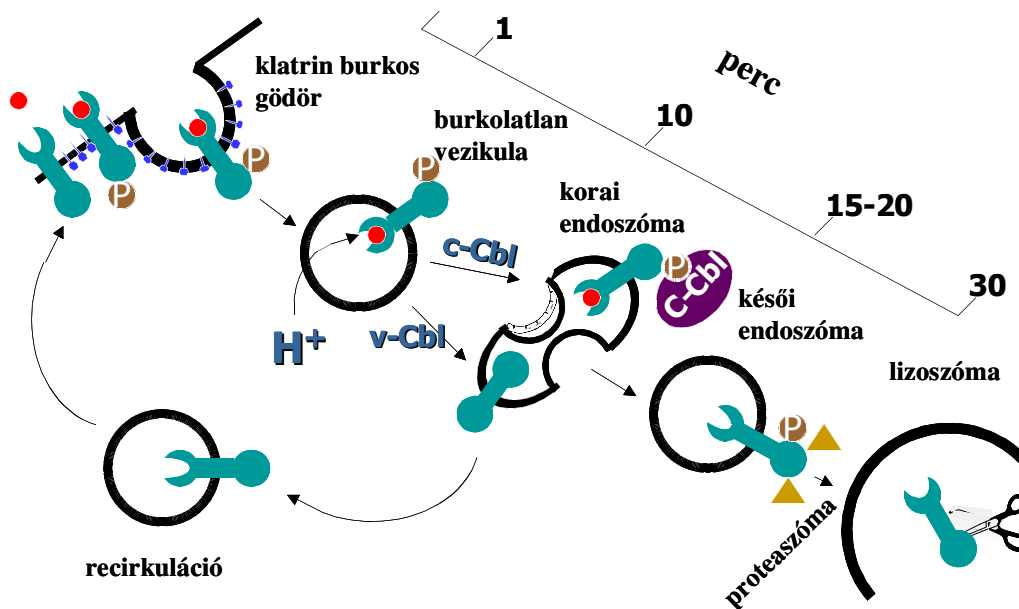
2.2 Az EGF-család jelátviteli folyamatát befolyásoló tényezők

Az intracelluláris szignálok specificitását és hatékonyságát az ErbB proteinek olyan pozitív és negatív effektorai határozzák meg, mint például a ligandum fajtája, az oligomer összetétele valamint a receptor specifikus szerkezeti sajátossága. A legjelentősebb befolyásoló tényező az eltérő foszfortirozin-kötő fehérjék megléte, melyek képesek kapcsolatot létesíteni a dimereket képező ErbB molekulákkal. Az autofoszforylálódott és ennek köszönhetően jelátvivő proteinnel összekapcsolódott intracelluláris domén a ligandum fajtájától, illetve a heterodimerizációs partner jelenlététől függően fog viselkedni (Olayioye és mtsai. 1998). A Shc és Ras fehérjék által mediált mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonal az ErbB3 ligandumok állandó célpontja; azonban a foszfoinozitol-3-kináz (PI3K) által aktivált apoptotikus kináz (Akt) valamint a p70S6K/p85S6K útvonal a legtöbb aktív dimer számára elérhető. A jelátviteli út kimenetelét az egyes útvonalak eltérő kinetikája is befolyásolja. Például a PI3K aktivációjának hatékonysága és kinetikája eltér a többi kinázétól, valószínűleg azért, mert az ErbB3 és ErbB4 receptorokkal közvetlenül lép kölcsönhatásba, míg az ErbB1 és ErbB2 receptorokhoz csak közvetett módon képes kapcsolódni (Soltoff és Cantley 1996).

Az ErbB indukált jelátvitelt a ligandum-indukált receptor endocitózisa zárja le, mely folyamat kinetikája erősen függ a receptor összetételétől, valamint az ubiquitin ligáz celluláris vagy virális (mutáns) formájának jelenlététől. Endocitózis során a receptorok klatrin burkos vezikulumban fűződnek le a sejtmembránból. Attól függően, hogy a burkolatlan vezikulákhoz celluláris vagy virális Cbl ubiquitin ligáz kapcsolódik, a fehérjék degradálódnak vagy újra a sejtfelszínre kerülnek (Levkowitz és mtsai. 1998) (**3. ábra**).

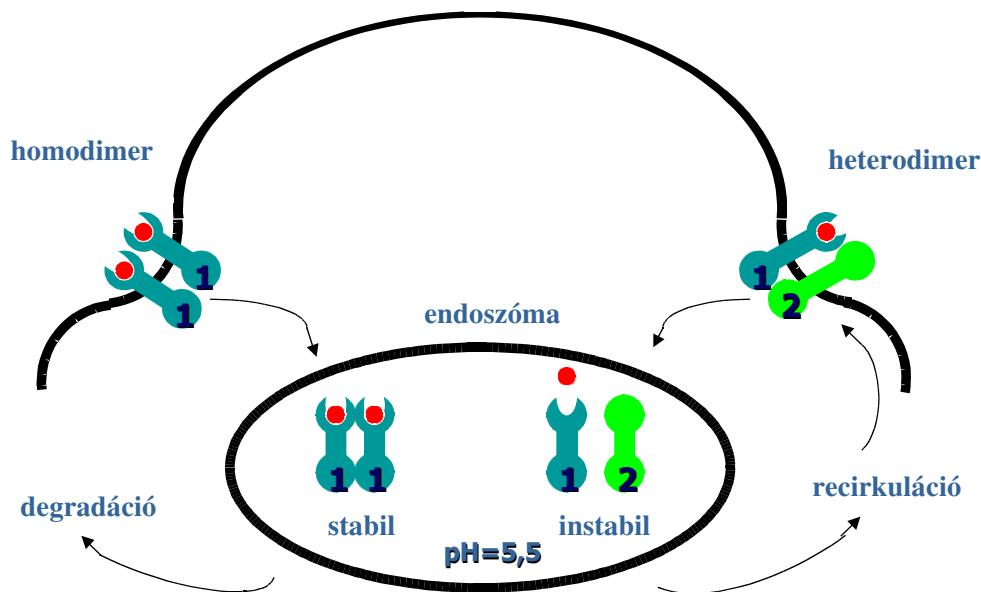
A receptorok 1045-ös tirozin oldallánca elengedhetetlenül fontos az ErbB jelátvitel Cbl-mediált szabályzásához, mely folyamatban a c-Cbl család adapter fehérjéi a Grb-2 fehérjéhez kötődve fejtik ki hatásukat. A Cbl ubiquitin ligáz továbbá részt vesz a citokin receptorok, immunreceptorok és integrinek szabályozásában is. N-terminális részen SH2

foszfortirozin-kötő domént (melyen keresztül aktivált PTK-hoz kötődik), illetve Ring-finger domént (ami E2 ubiquitin ligáz enzimeket köt) tartalmaz. C-terminálisa prolin/szerin-gazdag régióból (Grb2-höz, Src-családbeli kinázokhoz kötődik), tirozin foszforilációs helyekből (SH2 domént tartalmazó adapter fehérjéket köt) valamint ubiquitin-kötő doménből áll (van Leeuwen és mtsai. 1999a; van Leeuwen és mtsai. 1999b). Az Cbl ubiquitin ligáz által vezérelt endocitózis jelentős szerepet játszhat az EGFR-család tagjai ellen irányított antitest készítmények antitumor hatásának kifejtésében. Például, az L26-al, azaz egy ErbB2 ellenes antitest alkalmazásával az N87 humán gyomortumor sejtvonalon az ErbB2 receptorok degradációját figyelték meg fokozott ubiquitináció mellett. A degradáció mértékét a Cbl expressziója valamint a receptor 1112-es tirozin láncán található Cbl kötőhely megléte egyaránt befolyásolja. Ezen eredmények birtokában feltételezhető, hogy a trastuzumab, bár az ErbB2 receptor egy másik epitópjához kötődik, szintén Cbl-mediált receptor degradációt idéz elő (Klapper és mtsai. 2000).



3. ábra Az internalizált receptorok sorsa Cbl ubiquitin ligáz jelenlétében: Az ErbB indukált jelátvitelt a receptor endocitózisa zárja le. Endocitózis során a receptorok klatrin burkos gödörben fűződnek le a sejtmembránról, majd a burkolatlan vezikulából korai endoszóma képződik. A korai endoszómás állapotban attól függően, hogy celluláris (c-Cbl) vagy virális Cbl (mutáns, v-Cbl) ubiquitin ligáz kapcsolódik a receptorokhoz, a fehérjék vagy lizozómában degradálódnak, vagy újra a sejt felszínre kerülnek.

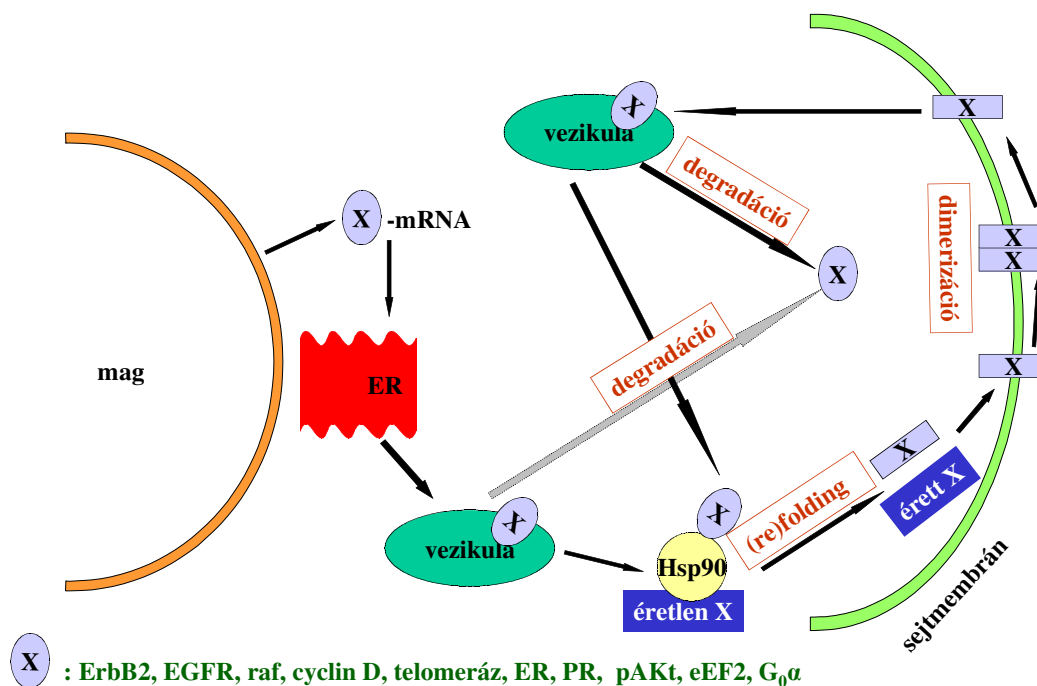
A receptorok sorsát meghatározó következő fontos tényező az aktivált ligandum-receptor komplex stabilitása (**4. ábra**). Az aktivált ErbB1 homodimerek viszonylagos stabilitásuknak köszönhetően a Cbl-hez kötődve az endoszómában maradnak, ezáltal lizoszómális lefűződést és degradációt előidézve. Az ErbB1-ErbB2 heterodimer azonban kevésbé stabil, így hamar szétdisszociál a Cbl ligázt is leválásra kényszerítve. Ezt követően a receptorok ismét a sejtfelszínre kerülnek (Lenferink és mtsai. 1998).



4. ábra A dimerek stabilitása degradációhoz és recirkulációhoz egyaránt vezethet: A receptorok sorsát az aktivált ligandum-receptor komplex stabilitása is meghatározza. Az aktivált ErbB homodimerek relatív stabilitásuknak köszönhetően a Cbl-hez kötődve az endoszómában maradnak, és lizoszómában degradálódnak. Az ErbB1-ErbB2 heterodimer azonban kevésbé stabil, hamar elválnak a receptorok egymástól és a Cbl ligáztól, minek köszönhetően a receptorok ismét a sejtfelszínre juthatnak.

A jelátviteli folyamatokban internalizálódott receptorok recirkulációjában a stresszfehérjék csoportjába tartozó Hsp90 (heat shock protein 90) dajkafehérje is aktívan részt vesz. A stresszfehérjék jelenléte nélkülözhetetlen az olyan proteinek szerkezetének visszaállításában, melyek valamilyen környezeti stressz hatására meghibásodtak. A Hsp90

egy olyan 90 kDa tömegű hőszokkfehérje, ami *passzív* módon segít a hibás szerkezetű proteineknek azáltal, hogy azok kilógó hidrofób felszínéhez kötődve megvédi a felszíneket az összetapadástól és a következményes aggregációtól, koagulációtól. Mivel ez a folyamat nem igényel ATP-t, így a sejt hőszokk hatására megnyilvánuló első védekezési reakciójaként is értelmezhető. Ezt követi az *aktív* segítség, ami energiaigényes, így ATP-hidrolízissel jár együtt. Ebben az esetben a helytelen szerkezetű szubsztrátfehérjét a stresszfehérjék kismértékben kitekerik, lehetőséget adva a proteinek arra, hogy visszatekeredve megtalálhassa a helyes, natív szerkezetet. Ennek a folyamatnak két fő irányítója a Hsp50 és a Hsp60 dajkafehérje (Csermely 2001), azonban a Hsp90, mivel ATP/ADP kötőhellyel rendelkező adenin nukleotid zsebet tartalmaz (Chiosis és mtsai. 2001; Chiosis és mtsai. 2003), szintén aktív részese lehet. A Hsp90 továbbá kismértékben mutáns fehérjék helyretekerésével számos olyan mutáció hatását képes semlegesíteni, melyek csendben meghúzódnak a hordozó egyed genetikai állományában (Csermely 2001). Megfelelő funkciójának hiányában legfontosabb kliens fehérjéinek (az ErbB2, EGFR, G_oα, raf, eEt2 kináz, ciklin D, telomeráz, ER, PR, valamint pAkt) abnormális konformációja ubiquitinációt, majd proteaszómális degradációt szenved. Helyes működésekor azonban a membránról lefűződő receptorhoz kötődve segít a harmadlagos és negyedleges szerkezet visszaalakításában, minek köszönhetően a receptor ismét a sejtfelszínre kerülhet (**5. ábra**). Ez a recirkuláció hozzájárulhat az emlőrák sejtfelszínén túlzott mértékben kifejezett ErbB2 felhalmozódásához, ami a daganatos sejtek fokozott proliferációjához vezet (Sausville 2001).



5. ábra A Hsp90 és kliens fehérjéi közötti kapcsolatot: Az endoplazmatikus retikulum felszínén lévő riboszómákról a fehérjék (X) vezikulákban fűződnek le. Lefűződést követően vagy degradálódnak, vagy Hsp90 kötődése révén az éretlen fehérjékből érett fehérjék jönnek létre, melyek képesek a sejtmembránban kifejeződni. Sejtfelszíni dimerizációt követően a fehérjék degradálódnak, vagy újra hajtogatódnak.

2.3 Az ErbB2 receptor túlzott mértékű kifejeződése, az ErbB2-pozitív daganatok

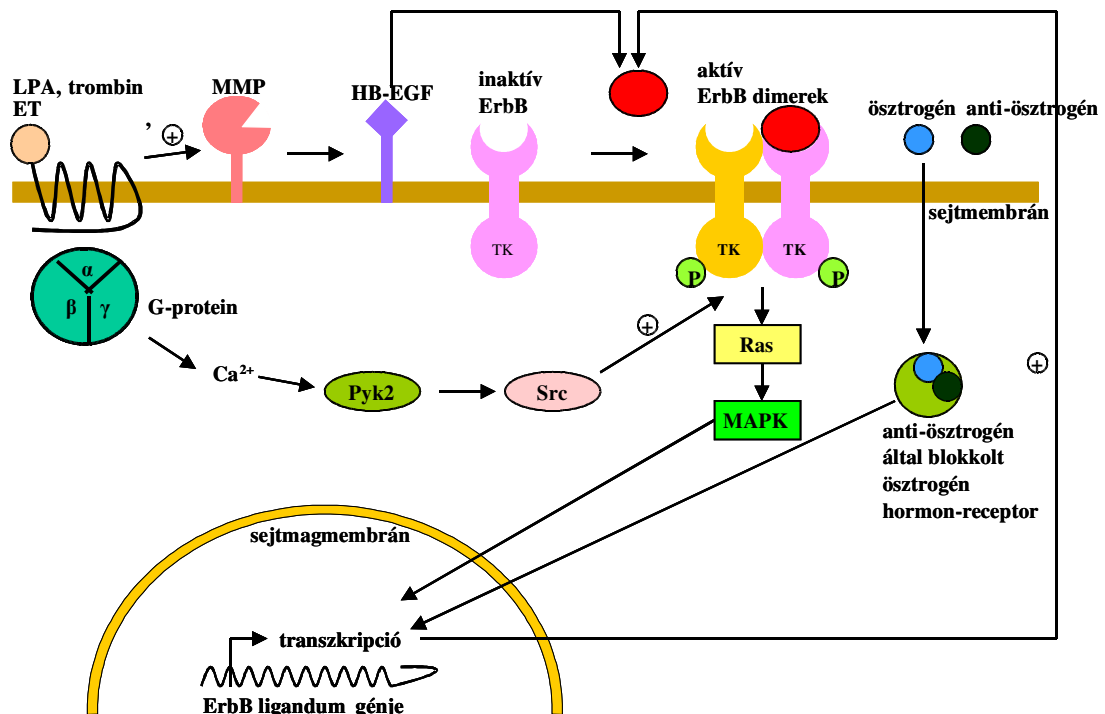
kezelésének nehézségei

Számos daganat fejezi ki sejteinek felszínén az ErbB2 receptort, köztük az emlőrákok, melyek közül az invazív duktális karcinómák 30%-a mutat ErbB2 gén amplifikációt, mely a fehérje magas szintű expressziójával társul (Slamon és mtsai. 1987). Az overexpresszió a tumor méretével, a tumorsejtek nyirokerekbe történő beáramlásával, az S fázisú sejtek növekvő arányával, valamint a szteroid receptorok hiányával egyaránt korrelál. Az invazív karcinómák korai fázisában a túlzott mértékű ErbB2 kifejeződés önmagában nem elegendő a jóindulatú daganat rosszindulatúvá történő átalakulásához (Ross és Fletcher 1998). Az esetek

jelentős részében ehhez a folyamathoz hozzájárul még az overexpresszióval társuló ösztrogénreceptor és progeszteronreceptor hiány is (Borg és mtsai. 1994). Ösztrogénreceptor-pozitivitás esetén az anti-ösztrogének bekötődése a hormonreceptorhoz gátolja a szteroid hormon bekapcsolódását, minek következtében az ösztrogén-aktivált jelátvitel blokkolódik, így a daganat progressziója lelassul. Az ösztrogén ugyanakkor elnyomja az ErbB2 promóterről induló génátírást, és ezáltal specifikusan gátolja az ErbB2-t overexpresszáló emlősejtek növekedését (Giani és mtsai. 1998). Annak az ösztrogénreceptor-deficiens betegnek azonban, kinek tumorában az ErbB2 receptor túlzott mértékben fejeződik ki, az anti-ösztrogén terápia akár káros is lehet (Carlomagno és mtsai. 1996). *In vitro* tanulmányok szerint az ErbB2 és NRG túlzott mértékű expressziója anti-ösztrogének adására hormonrezisztenciát idéz elő, illetve az esetek jelentős részében a daganatos sejtek növekedését teljes mértékben függetleníti az ösztrogéntől (Pietras és mtsai. 1995). Ennek az a magyarázata, hogy a meglévő csekély mennyiségű hormonreceptorhoz kapcsolódott anti-ösztrogén kivédi az ösztrogén hatását, így szabad utat nyitva az ErbB2 expresszióknak. Mindezt együttvéve, mind a molekuláris, mind pedig a klinikai megfigyelések arra utalnak, hogy a szteroid és ErbB útvonalak ugyan alternatív jellegűek, de funkcionálisan olyan összekapcsolódó folyamatok, melyek a sejtek proliferációját növelni képesek (**6. ábra**).

A daganat progressziót emellett a G-protein kapcsolt (GPC) receptorok (LPA, trombin és endotelin receptorok) is képesek befolyásolni az ErbB jelátvitelre kifejtett pozitív hatásuknak köszönhetően. Ezen receptorok elsősorban a mátrix-metalloproteinázokat (MMP) aktiválják, melyek olyan membrán-kötő ErbB ligandumokat hasítanak, mint például a heparinkötő EGF-szerű faktor (HB-EGF). A szabaddá vált ligandumok kötődhetnek az ErbB fehérjékhez és aktiválhatják azokat. A GPC-receptorok továbbá aktiválhatják közvetett módon az Src-t (valószínűleg a Pyk2 útvonalon keresztül), amely foszforilálja az ErbB intracelluláris doménjét. A receptor aktivációt követően a Ras-MAPK útvonalon keresztül az

ErbB ligandumokat kódoló gének átírása aktiválódik, amit még az anti-ösztrogénnel blokkolt szteroid-hormon-receptorok is erősítenek (Yarden és Sliwkowski 2001). Az ErbB2/neu onkogén fokozott mértékű kifejeződésével egyidőben megnő a tumorsejtek proliferációs készsége, a TNF- α -val (tumor nekrozis faktor) szembeni rezisztencia és a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) szekréció, valamint fokozódik a sejtek motilitása és aggregációs hajlama, de csökken az adhézis molekulák expressziója. Ez utóbbi három hatás metasztázis képződéséhez vezet.



6. ábra Az ErbB jelátvitelt előmozdító útvonalak: Az ErbB jelátvitelt a G-protein kapcsolt (GPC) receptorok (LPA, trombin és endotelin receptorok) is képesek befolyásolni, ezáltal a daganat progressziót elősegítve.

Mindezek fényében nem meglepő, hogy az ErbB2 rutinszerű meghatározása a daganatdiagnosztika egyik elterjedt eleme, és a fehérje különféle daganatterápiák molekuláris célpontjává vált az utóbbi időben. Többféle ErbB2 gátló stratégiát dolgoztak ki kísérletes

körülmények között. Az egyik ilyen eljárás az ErbB2-gén átírásának gátlása antiszensz oligonukleotidokkal. Egy másik eljárás során az ErbB2 működés gátlására tirozinkináz gátlókat, vagy specifikus ellenanyagokat alkalmaztak. Jelenleg a klinikumban a leghatásosabbnak bizonyult trastuzumabot (Herceptin) használják, ami az ErbB2-receptor extracelluláris doménje ellen irányított humanizált monoklonális antitest. A trastuzumab tumorgátló hatása mind kísérletes, mind pedig klinikai körülmények között arányos az ErbB2 receptor kifejeződésének mértékével. Magát a gyógyszert már több országban törzskönyvezték a ErbB2-pozitív előrehaladott emlőtumorok első vonalbeli kezelésére taxollal kombinálva, illetve másod- és harmadvonalbeli kezelésre monoterápiában adva. Egyéb adjuváns terápiaiban történő alkalmazását azonban még klinikai vizsgálatokban tesztelik (Campane és mtsai. 2003).

2.4 A trastuzumab humán emlőtumorokra kifejtett hatása

A Genentech által szabadalmaztatott trastuzumab (Herceptin) egy ErbB2 receptor ellen irányított, 4D5 jelű, egérben termeltetett monoklonális antitest variábilis régiójának antigénkötő szekvenciája, melyet emberben nem immunogén humán IgG-be építettek be (Carter és mtsai. 1992). Monoterápiában történő alkalmazása a metasztatikus emlődaganatos nők ~15%-ában volt eredményes, míg kemoterápiával történő együttes adása növelte a pozitív reakciók arányát (Baselga és mtsai. 1996). AC-kemoterápiával (adriamicin=doxorubicin és citoxán=ciklofoszfamid) együtt alkalmazva a páciensek 52%-ában hozott eredményt, viszont a kemoterápia önmagában csak az esetek 43%-ban volt hatásos. A trastuzumab-taxol kombinált terápia 43%-ra növelte az eredményes kezelések arányát a taxol-monoterápia 16%-ához képest.

A trastuzumab pozitív hatásának ismerete egyre elterjedtebbé teszi alkalmazását. Az FDA azonban kötelezően előírja a Dako Corporation által forgalmazott Herceptest elvégzését

a trastuzumab kezelés indikációjának felállítása előtt. A teszt értékelésénél a festődő sejtek arányát, a membránfestődés jellegét, valamint intenzitását vizsgálják, miknek ismeretében a tumort 0, 1, 2 vagy 3 kereszttel jellemzik (Toth és Szentkúti 2000). Klinikai tapasztalatok szerint az immunhisztokémiai háromkeresztes vizsgálatok elég jól korrelálnak a FISH-módszerrel kimutatott ErbB2 amplifikációval, a kétkeresztes eredmények azonban csak az esetek 24%-ában mutatnak átfedést (Dybdal és mtsai. 2005). A Hercepteszten két, vagy három kereszttel elérő daganatok általában jól reagálnak trastuzumab terápiára. A trastuzumab monoterápiás alkalmazása során azonban a betegek 4.7%-a szív működési zavarokkal küzdött, s ezt az arányt a kemoterápiával történő együttes alkalmazás fokozta.

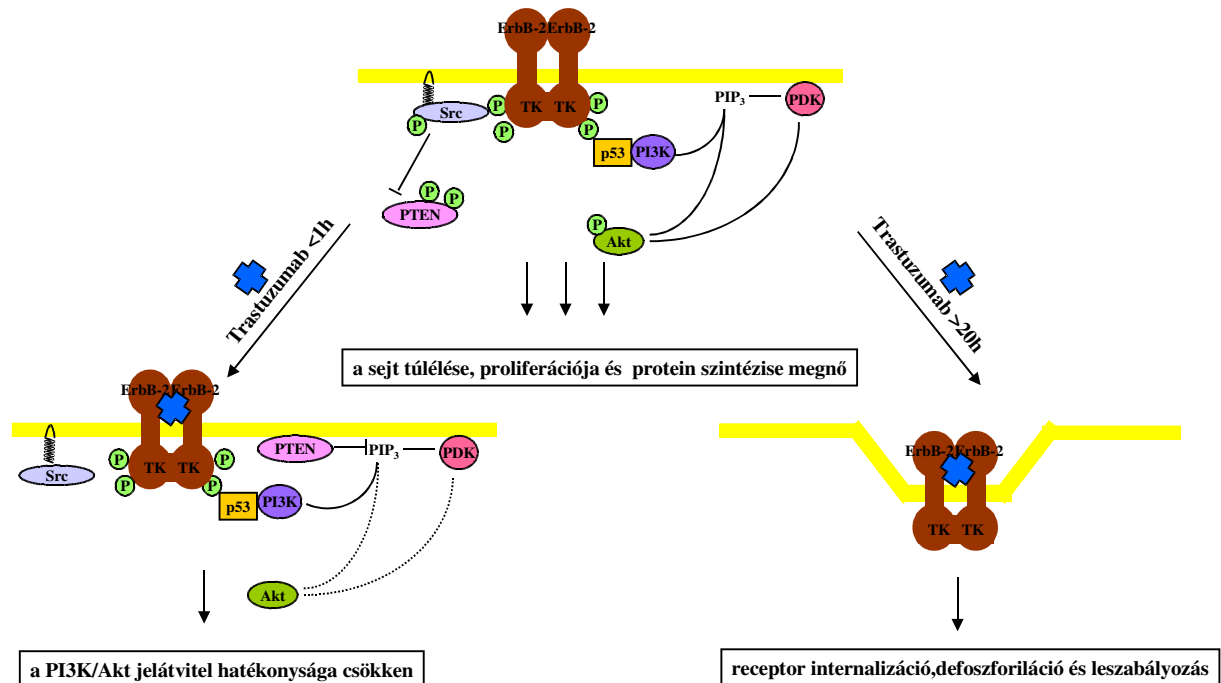
A trastuzumab monoterápiát az ErbB2-pozitív emlődaganatok metasztázisainak kezelésére is kipróbálták 4 mg/kg kezdő és 2 mg/kg heti fenntartó dózissal, ill. ezek duplájával is. Mindkét esetben enyhe fokú fájdalom, gyengeség, láz, hányinger, hányás, hidegérzet, fejfájás, hasmenés és kiütés jelentkezett, mely tünetegyüttes a nagyobb dózisú terápiánál a kezelés alatt állók 30%-ában fokozódott. A trastuzumab elsővonalbeli alkalmazása a paciensek elenyésző részénél szívpanasszal, leukopéniával, trombocitopéniával és sztomatitisszel járt. Mivel a mellékhatások intenzitásán kívül jelentősebb eltérést nem tapasztaltak a két dózis hatása között, így jelenleg az alacsonyabb koncentrációjút alkalmazzák (Tripathy 1998).

A trastuzumab pontos hatásmechanizmusa a mai napig tisztázatlan. Egyes kutatások szerint az ErbB2-höz kötődve a receptor leszabályozásával blokkolja a dimerképződést, minek köszönhetően a jelátviteli út gátlódik, emellett a TNF α -val szembeni rezisztencia lecsökken, az addhéziós molekulák expressziója visszaáll, a VEGF termelődése pedig mérséklődik (Lane 1998). A trastuzumab hatásmechanizmusát a sejtenként 1 millió ErbB2-t kifejező BT-474 humán emlőtumor sejtvonalon tanulmányozva megfigyelték, hogy trastuzumab adáskor számos fehérje szintézise és aktivitása mérséklődött S fázisban (pl.: Rb

foszforiláció, ciklin A, skp2), vagy G2 fázisban (ciklin B) (Lane 1998). A p27^{Kip1} Rb-aktivációt gátló, ciklin-függő kináz inhibitor expressziója megnőtt, minek következményeként a ciklin-függő kináz-2 (CDK2) aktivációja lecsökkent a sejtciklus G1 fázisában blokkot eredményezve. Az utóbbi hatására a sejt proliferációja lelassult (Sliwkowski és mtsai. 1999). A paclitaxel ezzel ellentétben G2-M fázisban eredményezett sejtciklus blokkot. A 4D5 jelű antitest *in vitro* biokémiai hatásain túl *in vivo* az immunrendszer közvetítésével is kifejti tumorelles hatását. Konstans régiójával az FcγRIII-hoz kötődve antitest-függő sejt által közvetített citotoxicitást (ADCC) eredményez (Clynes és mtsai. 2000), emellett még fokozza az ErbB2 internalizációját követően képződött peptidek prezentációját is (Kono és mtsai. 2004).

A trastuzumab terápia első klinikai sikerei ellenére kiderült, hogy az emlőkarcinómák nagy hányadában a trastuzumab kezelés hatástalan, és a kezdetben jól reagáló betegek esetén is gyakori a később kialakuló (szekunder) rezisztencia (Slamon és mtsai. 2001; Esteva és mtsai. 2002). A trastuzumab-rezisztencia feltehetően multifaktoriális, de néhány fontosabb okra vonatkozólag már vannak feltételezések. Ezek egyike szerint a trastuzumab szenzitív daganatos sejtekben (**7. ábra**) a PI3K katalitikus alegység és a p85 szabályozó alegység az aktivált ErbB2 intracelluláris doménjéhez kötődik, így a PI3K stimulálódik a PIP₃ termelődését elősegítve. Ezt követően a foszfoinozítid-függő protein kináz (PDK) a PIP₃-hoz kapcsolódik a PI3K-t és az Akt kinázt aktiválva. Ugyanakkor a stimulált transzmembrán receptorok foszforilációja során az Src a foszforilált ErbB2-höz kötődik, és aktiválódva a tumor szuppresszor PTEN (lipid foszfatázként is működik) foszforilációját elősegíti. Ez a mechanizmus azonban gátolja a PTEN plazmamembránbeli transzlokációját, minek köszönhetően a PI3K által generált PIP₃ nem defoszforilálódik. Ezen folyamatok végeredményeként a sejtek fokozott proliferációja és túlélése figyelhető meg. A trastuzumab rövid idejű hatása a PI3K-útvonal gyors leszabályozását eredményezi. A szer 1 óránál

rövidebb alkalmazása során az Src ledisszociál az ErbB2-ről, ami receptor-defoszforilációt és inaktivációt eredményez. Ennek köszönhetően a PTEN nem foszforilálódik a Src útvonalon, s a plazmamembránban maradva a PIP₃ defoszforilációját okozza. A 20 óránál hosszabb trastuzumab hatás mindemellett elősegíti még az ErbB2 defoszforilációját, majd ezt követő internalizációját és degradációját is. Mind a rövid-, mind pedig a hosszútávú kezelés gátolja az aktivált ErbB2 által kifejtett sejtes válaszokat. A trastuzumab szenzitív karcinómákkal ellentétben számos rezisztens daganatban PTEN-deficienciát észleltek, így ezen foszfatáz gátló hatása nem érvényesül trastuzumab kezelés esetén (Nagata és mtsai. 2004).



7. ábra Az ErbB2/PI3K jelátviteli útvonal gátlása trastuzumabbal: 1 órán belüli Trastuzumab kezelés hatására a PTEN a sejtmembránban a PIP₃ képződését gátolva a sejt túlélését és proliferációját mérsékli. A 20 óránál hosszabb kezelés receptor internalizációt, defoszforilációt és leszabályozást eredményez.

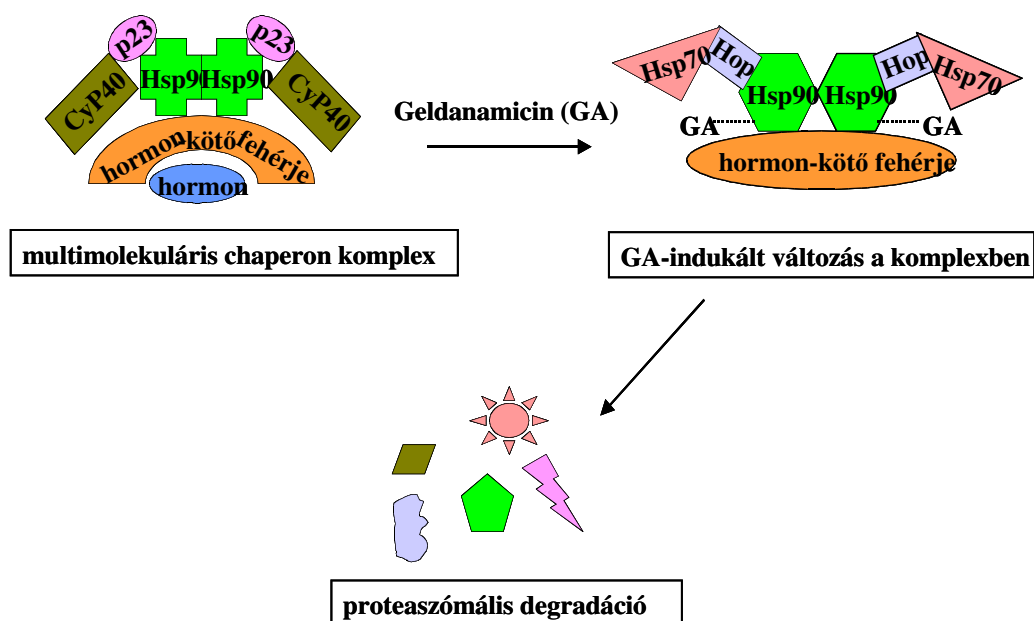
A PTEN defektus mellett számos egyéb lehetséges rezisztencia mechanizmust is felfedeztek különféle ErbB2-pozitív daganatokban, köztük az EGF-szerű ligandumok autokrin termelődését (Motoyama és mtsai. 2002), az IGF-I receptor jelátviteli útvonalának aktiválódását (Lu és mtsai. 2001), a trastuzumab kötőhely maszkírozását a MUC4

szialomucin komplex által (Price-Schiavi és mtsai. 2002; Nagy és mtsai. 2005), valamint a csökkent ADCC reakció szerepét (Kono és mtsai. 2004).

2.5 A kis molekulatömegű inhibitorok terápiás alkalmazása: a 17-allilamino-17-dimetoxi geldanamicin

A kis molekulatömegű, természetben is előforduló herbimicin, genisztein, emodin és anzamicin mellett a szintetikus analógok is felismerik az ErbB fehérjék, valamint dajkafehérjék nukleotid-kötő helyét. *In vitro* és állat kísérletek egyaránt igazolták, hogy az ErbB1-et, illetve ErbB2-t fokozott mértékben kifejező sejtek proliferációja csökken ezen hatóanyagok jelenlétében (Levitzki és Gazit 1995; Fry és mtsai. 1998).

Az emlődaganatos betegek jelentős része két fő terápiás célponttal jellemezhető, a Hsp90 dajkafehérje kliens proteinjének tekintett ErbB2 fehérjével, illetve ösztrogén- és progeszteronreceptorral. A kezdeti hormonterápiára pozitív választ adó tumorok 1 éven belül rezisztenssé váltak a kezelésre, így e probléma megoldására proklínai fázisban anzamicin származékot alkalmaztak, mely az ösztrogén receptor funkciót befolyásolta (Bagatell és mtsai. 2001). Ez a hatóanyag a Hsp90 dajkafehérje működését gátló geldanamicin volt, amit *Streptomyces hygroscopicus*-ból izoláltak először (Chiosis és mtsai. 2003). Az ösztrogén- és progeszteronreceptorok olyan multimolekuláris komplexek, melyek a hormonkötő fehérjéken kívül egyéb esszenciális chaperont (pl.: Hsp70, Hsp90) is tartalmaznak. A geldanamicin ezen komplex Hsp90 fehérjéjéhez kötődve a több molekulát tartalmazó szerkezetet felbontja és így a hormonreceptor érési folyamatát leállítja (**8. ábra**). A ligandumkötő konformáció ennek köszönhetően nem alakul ki, s így a hormonreceptorok proteaszómális degradációt szenvednek (Bagatell és mtsai. 2001).



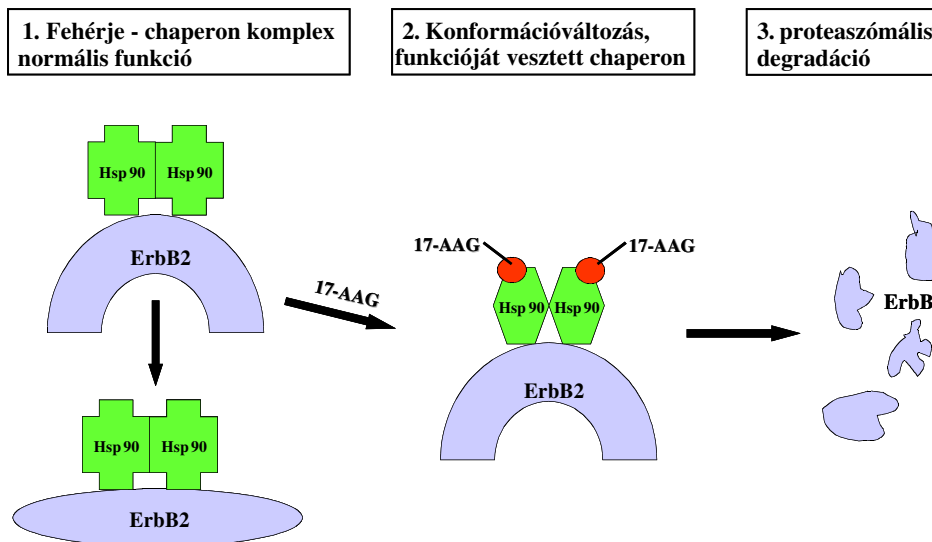
8. ábra A geldanamycin hatása a multimolekuláris komplexre: A multimolekuláris chaperon komplexben lévő Hsp90-hez kötődött geldanamycin a Hsp90 működését gátolja, így a hőszokk fehérje kliens proteinjeivel együtt degradálódik.

A geldanamycin nemcsak steroid receptorok funkcióját gátolja, hanem a Raf-1 kinázok és ErbB tirozinkinázok működését is hasonlóan befolyásolja, ezáltal számos daganatos sejt növekedését és túlélését gátolva. Emellett elősegíti a v-Src, Bcr-Abl és p53 mutáns fehérjék internalizáció utáni degradációját is anélkül, hogy ezen mutáns formák normális celluláris megfelelőit befolyásolná. Geldanamicinnel való kezelés során a sejtciklus G1 fázisban reked meg, amit morfológiai és funkcionális differenciáció és/vagy sejtpusztulás követ. A felsorolt előnyök ellenére azonban magát a geldanamicint nem alkalmazzák a klinikumban, mert jelentős májkárosodást okoz (Chiosis és mtsai. 2003).

A Hsp90 dajkafehérje működését egy geldanamycin származékkal, a 17-allilamino-17-dimetoxi-geldanamicinnel (17-AAG) is lehet gátolni, melyet jelenleg mindössze egy első fázisú tesztben kapnak emlődaganatos betegek, monoterápiaként. Ez a továbbfejlesztett változat a geldanamicinnel ellentétben nem okoz májkárosodást és szövetpusztulást. *In vitro* kísérletekben különböző sejtvonalaknak adták 2 nM és 40 μ M közötti tartományban, minek

hatására a sejtek proliferációja mérséklődött. A szer maximális aktivitását a Hsp90-kötő affinitásának megfelelő mikromoláris koncentrációban mutatja, ennek ellenére az esetleges mellékhatások elkerülése érdekében a humán terápiában az alacsony nanomoláris koncentrációkban alkalmazzák. A 17-AAG a Hsp90 dajkafehérje N-terminális felőli konzervált zsebbe kötődik. Ennek, a chaperon szabályozásában fontos szerepet játszó zsebbnek két endogén liganduma ismert, az ATP és ADP. Az ágens beékelődése gátolja az ATP bekötődését, így a Hsp90-tartalmú multimolekuláris komplex összetétele megváltozik, a kötött fehérje működése módosul. Az ATP bekötődés blokkolása azért fontos, mert az ép működésű sejtekkel ellentétben számos tumorsejtben a Hsp90 jelentősebb ATP-áz aktivitással bír, ami elősegítheti pl. az ErbB2 fehérje újbóli kijutását a sejt felszínre (Chiosis és mtsai. 2003).

17-AAG hatására az ErbB2 gyorsan degradálódik (**9. ábra**), így sejt felszíni expressziója lecsökken. Ennek következményeként az ErbB3-asszociált PI3K aktivitás mérséklődik, ami maga után vonja az Akt aktivitás csökkenését, valamint az Akt szubsztrátumok defoszforilációját. Ez a folyamat vezethet a D-ciklin expressziójának mérséklődéséhez, ami a p27^{Kip1} kifejeződését elősegíti. A CDK2 aktivációja így lecsökken, minek eredményeképpen G1 fázisban megreked a sejtciklus a sejtek szaporodását lassítva (Basso és mtsai. 2002). Mivel mind a 17-AAG mind pedig a trastuzumab hasonló módon változtatja meg a daganatos sejtek jelátviteli út vonalait, így elvileg egymás hatását potencírozhatják.



9. ábra A 17-AAG hatása az ErbB2 fehérjére: A Hsp90 az ErbB2 fehérjéhez kötődve segít annak a harmadlagos és negyedleges szerkezet kialakításában. A Hsp90-hez kapcsolódó 17-AAG azonban gátolja a hőszokk fehérje működését, ami az ErbB2 degradációjához vezet.

2.6 A fotodinámiás terápia (PDT)

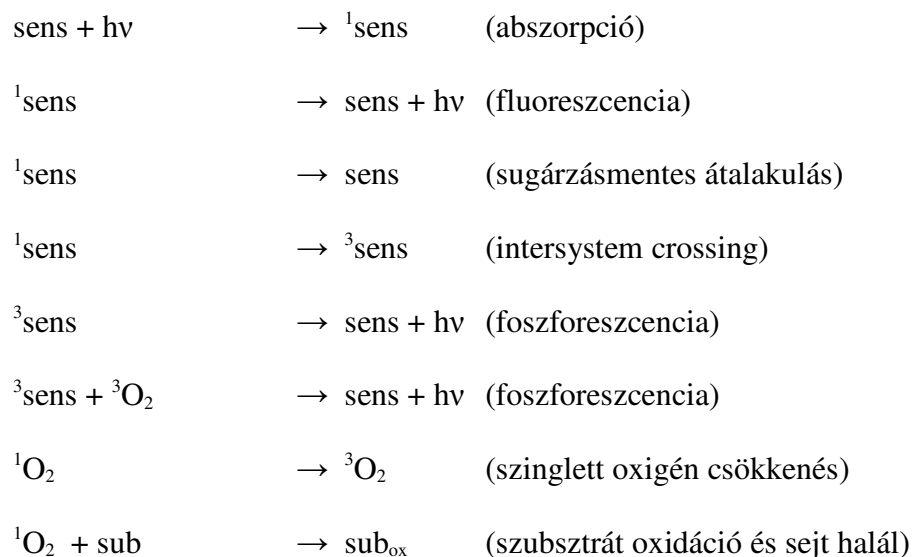
A tumorok hatékony kezelése aktuális probléma a klinikumban, ugyanis jelenleg a rendelkezésre álló terápiák közül nincs olyan monoterápia, ami önmagában elég hatásos lenne. A sebészileg maradéktalanul el nem távolítható, ill. többszörös metasztázisokat képző daganatok esetében a kemoterápia a leggyakoribb megközelítés, azonban az alkalmazott citosztatikumok kivétel nélkül komoly mellékhatásokat okoznak (Oktay és mtsai. 2001; Oktay és mtsai. 2004; Shapiro és mtsai. 2001; Tran és mtsai. 2000). A kemoterápiát gyakran radioterápiával is kombinálják (Naunheim és mtsai. 1992), azonban ennek is komoly mellékhatásai vannak (Halverson és mtsai. 1993).

Daganatos és egyéb proliferatív elváltozások kezelésére egy viszonylag új módszer a fotodinámiás terápia (PDT). A fotoérzékeny anyagok viselkedését megvilágítás hatására már 1900-ban vizsgálta Oscar Raab papucsállatkákon (Strizhak 1996). A PDT modern korszaka a Mayo klinikán Lipson és Schwartz megfigyelésével kezdődött az 1960-as években.

Észrevették, hogy hematoporfirin injektálásakor a rákos szövetek fluoreszkálnak. Ettől kezdve vizsgálták a jelenség hatásmechanizmusát, és optimalizálták terápiás hatását mind állatmodelleken, mind humán tumorok kezelésére. Ezeknek a tanulmányoknak köszönhetően különböző fotoérzékeny anyagokat fejlesztettek ki, melyek közül az első a porfirin oligomer elegyből álló Photophrin® volt (McCaughan és Williams 1997).

A PDT-t az 1970-es évektől kezdték el preklinikai és klinikai tesztekben alkalmazni. A terápia során a fotoérzékeny anyagot parenterálisan, intravénásan, vagy intraperitoneálisan adják, így a véráramon keresztül jut el a tumoros szövethez, ahol feldúsul (Qian és mtsai. 1987). A szelektív akkumuláció időfüggő, pl.: a napjainkban leggyakrabban alkalmazott chlorin e6 három óra múlva éri el a célszövetet és 24 órán belül stabilizálódik (Kostenich és mtsai. 1991). A stabilizációt követően a megfelelő gerjesztő fény hullámhosszát kétféle elv szerint választják meg. Az egyik megválasztási szempont az, hogy a hosszabb hullámhossz jobban áthatol a szöveteken, mint a rövidebb, így az optimális hullámhossz tartomány a 600-700 nm-es sáv (Bolin és mtsai. 1984). A másik szempont az, hogy a vörös tartományon belül a megfelelő gerjesztő fény hullámhossza erősen függ a fotoérzékeny anyag abszorpciós maximumától, ami pl.: a fotofrin II esetében 630 nm, a ftalocianinnál pedig 675 nm. Ennek ismeretében az alacsony energiájú lézereket (soft laser) egyre gyakrabban és szélesebb körben alkalmazzák a terápia során (Ferrario és mtsai. 1991). Számos klinikai tanulmányban azonban a lézereket nem-lézer típusú fényforrásokkal helyettesítik, mint pl. wolfrám, halogén és xenon lámpák (Ziolkowski és mtsai. 1995). A megvilágító fény jellegétől függően beszélhetünk fotodinámiás diagnózisról (PDD) és terápiáról (PDT). A PDD esetében UV fénnel világítják meg a tumorban felhalmozódott fotoérzékeny anyagot és a fluoreszcenciát detektálják. A PDT-nél azonban 600 nm-nél nagyobb hullámhosszat alkalmazva a tumor sejtjeit és vaszkularizációját roncsolják (Betz és mtsai. 2002).

A fotoszenzitizáló anyag akkumulációját és a megfelelő hullámhosszal történő megvilágítást követően számos fotokémiai reakció iniciálódik (**10. ábra**). A tumor nekrozist három fő mechanizmus idézi elő. Ezek közül az I. típusú mechanizmus (TO) a reaktív gyökök képződése, a II. típusú (TT) mechanizmus során a gerjesztett, tripllett állapotú fotoérzékeny anyag és az alapállapotú molekuláris oxigén reakciójából szinglett oxigén keletkezik (Strizhak 1996; Gal 1994). A III. típusú reakció (MTO) során a tumor sejtekben *in situ* képződött gyökök közvetlenül reagálnak a tripllett állapotú fotoérzékeny anyagokkal (Gal 1994). A szinglett oxigén és a szabad gyökök reakciója a sejt membránját, a mitokondriumot, a lizoszómát, valamint a sejtmagot károsítja, ami a sejt pusztulását eredményezi.



10. ábra PDT által előidézett fotokémiai reakciók: sens: alapállapotú fotoérzékeny anyag, $^1\text{sens}$: gerjesztett tripllett állapotú fotoérzékeny anyag, $^3\text{O}_2$: alapállapotú oxigén, $^1\text{O}_2$: gerjesztett szinglett állapotú oxigén.

2.7 Cisztein proteináz inhibitorok (CPI)

A tumorsejtek cisztein proteinázai kritikus szerepet játszanak az extracelluláris mátrix elemeinek (laminin, kollagén és elasztin) proteolitikus kaszkádon keresztül történő

bontásában (Foekens és mtsai. 1998; Buck és mtsai. 1992). A tumorsejtekben a cisztein proteináz családba tartozó katepszin enzim aktivitása megemelkedik, ami angiogenikus vaszkularizációt és a karcinómák invazivitását eredményezi (Joyce és mtsai. 2004). Ezen enzimek gátlását a szervezet által is termelt cisztein proteináz inhibitorok (CPI) végzik, melyek hatására a daganat növekedése mérséklődik. Tumoros páciensek esetében azt tapasztalták, hogy a CPI mennyisége igen alacsony, így ezen inhibitor pótlása indokolt lehet, mivel a cisztein proteinázok és inhibitoraik aktivitása közötti egyensúly a tumor sejtek agresszivitását jelentős mértékben befolyásolja (Lah és mtsai. 1997). Normál szövetekben, az extracelluláris proteolízist az endogén inhibitorok szabályozzák, míg patológiás folyamatokban a proteinázok és inhibitoraik közötti megzavart egyensúly válik uralkodóvá.

A calpain egy olyan kalcium aktivált cisztein proteináz, amely a sejtek alakváltozását, mozgékonyágát és apoptózist irányítja. A proteináz két formája a calpain I és II citoszolikus proteinek, melyek a sejtben különböző kötőhelyekhez transzlokalizálódnak. A calpain működését két szabályozó protein, a kalpasztatin (a calpain specifikus endogén inhibitora), és a 28 kDa-os szabályozó alegység határozza meg. Kimutatták, hogy a calpain II az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi készülékben található specifikus proteinekkel kolokalizálódik. Az organellumok proteináz K-val történő kezelése megmutatta, hogy a calpain I és II, a kalpasztatin, valamint a szabályozó alegység az organellumok membránjának citoszolikus felszínéhez kötődik, míg a calpain II egyik alegysége és szabályozó alegysége megtalálható az organellumok lumenében is (Hood és mtsai. 2004).

A kaspázok szintén a cisztein proteinázok családjába tartoznak és a proteinek aszpartát reziduumok melletti hasításért felelősek. Kiemelkedő szerepet játszanak az apoptózis kiváltásában, ezen kívül aktiválásuk olyan jellegzetes morfológiai változásokat idéz elő a sejtben, mint pl. a zsugorodás, a kromatin kondenzáció, a DNS fragmentálódás vagy a plazmamembránbeli bleb képződés (Degterev és mtsai. 2003).

A legumain egy lizoszomális cisztein proteináz, mely fontos szerepet játszik az endoszomális/lizoszomális degradációs rendszerben. A legumain hiánya a lizoszomális cisztein proteinázok egy másik csoportjának a prokatepszin B, H és L-nek az akkumulálódásához vezet. A legumain számos tumorban (pl. vastagbél, prosztatata és emlőrákok) nagyfokú expressziót mutat, s jelentősen fokozza az inváziót és metasztázisképzést (Liu és mtsai. 2003). A proteináz membrán-kötött vezikulákban koncentrálódik a tumoros sejtek invadopódiájában, ahol integrinokkal kolokalizálódik. Az aszparaginil-endopeptidázként is ismert legumain az Asn és Asp egységeknél hasítja a peptidkötést P1 pozícióban (Shirahama-Noda és mtsai. 2003; Niestroj és mtsai. 2002). A legumain gátlását illetően eddig meglehetősen kevés tanulmány született. Ezen tanulmányok olyan endogén inhibitorok használatát vizsgálták, mint pl. a cisztatin C (Alvarez-Fernandez és mtsai. 2005; Cheng és mtsai. 2006).

Az cisztein proteáz inhibitorokat általában humán placentából izolálják, az általunk használt cisztatin azonban egy olyan 120 aminosav és két diszulfid-híd tartalmú inhibitor, amit először tojásfehérjéből nyertek. Jelentős cisztein proteináz aktivitást csökkentő hatásuk miatt a CPI fehérjék az inhibitor terápia újabb területét nyitották meg (Lah és Kos 1998).

2.8 Az angiogenezis szerepe a tumorok kialakulásában

Az angiogenezis során képződött vérerek a szolid tumorok növekedése mellett a metasztázis képződését is elősegítik. Magát a folyamatot a hipoxia is stimulálja, minek hatására a daganatos sejtek egyre nagyobb mennyiségben termelik az angiogenikus faktorokat, úgy mint a TNF-t, FGF-t, valamint a VEGF-t (Fajardo és mtsai. 1992; Miles és mtsai. 1994). A fokozott citokin koncentráció maga után vonja a kapilláris erek képződését a növekvő tumor központjában (Friedlander és mtsai. 1995). Angiogenezis nélkül a tumor nem fejlődik tovább 2-3 mm-es átmérőnél (Leibovich és mtsai. 1987).

A vaszkularizációban szerepet játszó VEGF a 2-es típusú VEGF receptorhoz kötődve az endotél sejtek migrációját és proliferációját mozdítja elő, míg az 1-es típusúhoz kötődve a sejt migrációján túl az endotél sejtek „szöveti faktor” szekrécióját is beindítja (Ferrara és mtsai. 2003). A VEGF túlzott mértékű termelődése számos daganat esetén tumor progresszióval, valamint rossz prognózissal társul (Wey és mtsai. 2005). A vaszkuláris permeabilitási faktorként ismert VEGF-A a VEGF-család legalaposabban jellemzett tagja. Ezen faktor megemelkedett koncentrációja a fiziológias angiogenezis során megnöveli a mikrovaszkuláris permeabilitást, minek hatására a környező szövetek normálisan antiangiogenikus rétege proangiogenikus szövétté válik. A VEGF-ről kimutatták, hogy nekrozis gátló hatásának köszönhetően előmozdítja az antiapoptotikus Bcl-2 protein működését, ezáltal stimulálva a foszfatidilinozitol 3'-kináz/Akt útvonalat, amely az endotél sejtek túlélését serkenti (Dvorak 2002).

Tumorsejtekben a növekedési faktor receptorok mennyisége befolyásolja az angiogenikus faktorok kifejeződésének mértékét, ami közvetve járul az angiogenezis előmozdításához. Például az EGFR és az ErbB2 az emlő- és gyomorrák sejtek VEGF termelésének szabályzásában játszanak fontos szerepet (Akagi és mtsai. 2003). Számos onkogén (pl.: c-Src) is fokozhatja a VEGF termelődését (Ellis és mtsai. 1998). A rosszindulatú szolid tumorok egy részének molekuláris patogenezisében résztvevő p53 tumor szupresszor gén szintén központi szereppel bír a VEGF szabályozásában. Emlőkarcinóma sejtek esetében a p53 fehérje és az Sp1 transzkripció faktor közötti közvetlen kapcsolat a VEGF promóterról történő átírást gátolja (Carmeliet és mtsai. 2001).

3. Célkitűzések

Munkánk során a klinikai gyakorlatban már alkalmazott trastuzumab kezelést és fotodinámiás terápiát kombináltuk kismolekulájú inhibitorokkal, és vizsgáltuk hatékonyságukat emlőkarcinómák kezelésében.

Kísérleteinkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- A 17-AAG-vel gátolt Hsp90 dajkafehérje megváltoztatja-e az ErbB2 fehérje aktivációs folyamatát, és ez hatással lehet-e a tumorsejtek proliferációjára?
- *In vitro* körülmények között a trastuzumab hatását lehet-e potenciózni 17-AAG hozzáadásával trastuzumab szenzitív és rezisztens sejtvonalak esetén?
- Implantált szolid emlőkarcinóma kezelésére *in vivo* alkalmazott fotodinámiás terápia hatását lehet-e fokozni az extracelluláris mátrix bontásában aktívan résztvevő cisztein proteináz enzimek gátlásával?
- Amennyiben a fotodinámiás és az inhibitor terápia együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyul, melyek a kombináció optimális feltételei, és állhat-e a háttérben a VEGF szintet csökkentő hatás?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Az kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak és állatmodellek

In vivo összehasonlító kísérleteinket trastuzumab-rezisztens és szenzitív sejtvonalakon végeztük. Rezisztens sejtvonalként a JIMT-1-et alkalmaztuk, melyet Jorma Isolatól, finn kollaborációs partnerunktől (Laboratory of Cancer Biology, Tampere University and University Hospital Institute of Medical Technology, Tampere, Finland) kaptunk (Tanner és mtsai. 2004). Ez a karcinóma sejtvonal egy 62 éves emlődaganatos, trastuzumabra nem reagáló nőbeteg pleurális áttétjéből származik. A kontrollként felhasznált szenzitív sejtekhez hasonlóan ezek a sejtek is egyrétegben kitapadva nőnek és SCID egérben xenograft tumort képeznek. A JIMT-1 sejtvonal ösztrogén- és progeszteron-receptor deficiens, ugyanakkor immunhisztokémiai pozitivitást mutat mind citokeratin 5/14-re mind pedig 8/48-ra. Ezen sejtek trastuzumab kezelésre *in vitro* és xenograft formában egyaránt rezisztensek. A sejtek amplifikált ErbB2 onkogénnel rendelkeznek, amely azonosítható mutációt nem tartalmaz. A JIMT-1 sejtek felszínén az ErbB2 fehérje túlzott mértékben fejeződik ki, az ErbB1, ErbB3 és ErbB4 receptorok az SKBR-3 sejtekéhez hasonlóan kisebb mértékben expresszálódnak. A kismolekulájú tirozinkináz inhibitorok, a Ci1033 és a ZD1839 gátolják a JIMT-1 sejtek proliferációját, de a gátlás mértéke a BT-474 sejtekhez képest kisebb (Tanner és mtsai. 2004). Kontrollként az ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) által fenntartott trastuzumab szenzitív SKBR-3 sejtvonalat alkalmaztuk.

Mindkét sejtvonalat 37 °C-on és 5% CO₂-tartalmú levegőn tenyésztettük. Az SKBR-3 sejtek olyan DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA) médiumban nőttek, amely 10% FCS-t (Fetal Calf Serum, SIGMA), 2 mM L-glutamint (ICN) valamint antibiotikumot tartalmazott. A JIMT-1 sejtek tenyésztéséhez 1:1 arányú 10% FCS-DMEM és Ham-féle F-12 médium elegyét alkalmaztuk. A sejtvonalakat 250 ml-es (Greiner bio-one)

flaskában inkubáltuk, 3-4 naponta passzáltuk. Az áramlási citometriás kísérletekhez a sejteket 0.05% tripszin és 0.02% EDTA (SIGMA)-tartalmú PBS oldattal szuszpendáltuk fel. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket 12 mm átmérőjű fedőlemezekre, ill. Lab-TekTM II 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában (Nalge Nunc International, Rochester, NY) növesztettük 80%-os konfluencia eléréséig. A stimulációs kísérletek előtt 24 óráig szérum-mentes médiumban éhezettük a sejteket.

In vitro kísérleteinkben 3-3.5 hónapos, 200 g-os nőstény Wistar patkányokat alkalmaztunk, melyeket a „Guiding Principles in the Care and Use of Animals” (Official Journal Announcing Current Legislation in Poland (Dz.U), 2002: 135 p. 1141) követelményeinek megfelelően tartottunk. A Gliwice-i Onkológiai Intézetből (Lengyelország) kapott patkány eredetű transzplantálható emlőkarcinómát homogenizáltuk, majd az 1 ml homogenizátumot 0.5 ml fiziológiás sóoldattal elegyítve szubkután implantáltuk a patkányok bal oldalába (Saleh és mtsai. 2001). A HercepTest (DAKO) immunhisztokémia, melyet Dr. Szöllősi Zoltán (DE OEC Patológiai Intézet) készített, kimutatta, hogy a tumor HER2 negatív.

4.2 Alkalmazott antitestek és vegyületek

In situ hetero- és homodimerizációs vizsgálatokhoz az ErbB2 sejtfelszíni receptor jelölésére az egyik epitópja ellen irányított, ún. 2C4 jelű antitestet alkalmaztunk, mely a Genentech Inc. (South San Francisco, CA) ajándéka volt. Az ErbB1 fehérje jelölését az 528 jelű antitesttel végeztük, amit laboratóriumunkban izoláltunk a megfelelő hibridóma sejtvonal (American Type Culture Collection, Rockville, MD, Cat # HB-8509) által termelt felülúszóból protein-C gyöngyök (Sigma) segítségével. Ezen antitesteket Cy3 és Cy5 szulfoindocianin alapú festékekkel (monofunkcionális szukcinimidil-észter, Amersham, Piscataway, NJ), valamint AlexaFluor 488-cal (Invitrogen, Carlsbad, CA) konjugáltuk a gyártó útmutatása szerint. A foszforilált ErbB2 jelölését a Lab Vision Corporation-tól vásárolt

Ab-18 jelű elsődleges antitesttel (PN2A klón) végeztük, ami a receptor aa1242-1255 foszforilált tirozint tartalmazó intracelluláris szekvenciájára specifikus. A mikroszkópos mérések esetén másodlagos antitestként AlexaFluor 488-GaMIg Fab-et (Molecular Probes / Invitrogen) alkalmaztunk, míg az áramlási citometriás mérésekhez az Ab-18-at közvetlenül konjugáltuk AlexaFluor 488-cal.

A sejtek stimulálását egér eredetű EGF-ral végeztük, amit az IC Chemikalien forgalmaz (Ismaning, Germany). A sejtek kezelésében felhasznált trastuzumabot (Herceptint) a Hoffman-La Roche AG-től szereztük be. A 17-AAG a Kosan Biosciences, Inc. (Hayward) ajándéka volt, DMSO-ban, 10 mM-os törzsoldatként -20 °C-on tároltuk.

In vitro kísérleteinkben tojásfehérjéből izolált cisztein proteináz inhibitor (CPI), azaz cisztatint (Biochemical Laboratory of the Department of Gynecology and Obstetrics, Wrocław Medical University) (Saleh és mtsai. 2003) alkalmaztunk a tumorhordozó patkányok cisztein proteináz aktivitásának csökkentésére. A fotodinámiás terápia (PDT) fotoszenzitizáló szereként (PS) hematoporfirin származékot (HpD) és klorin e6-ot (Ce6) használtunk (Frontier Scientific, Porphyrin Products, Inc., Logan, UT, USA). Mindkét fotoszenzitizálót 0.05 M NaOH tartalmú fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd ebből 0.5-0.5 ml-nyi oldatot injektáltunk intraperitoneálisan a Wistar patkányokba 10, illetve 20 mg/testtömeg-kg koncentrációban. A tumorokban 24 óra alatt akkumulálódott fotoszenzitizálót Penta (Teclas) lámpával világítottuk meg maszk nélkül, 7 percen át. A megvilágító fény hullámhosszát Ce6 esetében 654 ± 20 nm-es, míg HpD esetében 630 ± 20 nm-es sávszűrővel állítottuk be. Az alkalmazott fényintenzitás 230 mW/cm^2 volt, a teljes fotondózis pedig 90 J/cm^2 . Ez az alacsony dózis érték kismértékben roncsolja a sejteket, így lehetővé válik a PDT és CPI együttes hatásának nyomonkövetése.

A továbbiakban külön nem jelölt kemikáliák a Sigma (Schnelldorf, Germany) cégtől származnak.

4.3 Kezelés 17-AAG-vel, trastuzumabbal, valamint a kettő kombinációjával

A 17-AAG, a trastuzumab és a kettő együttes hatásának vizsgálatához a sejteket 8×10^4 sejt/cm² sűrűségben passzáltuk, majd a letapadást követően az egyes mintákat 0, 2, 10, 40, 100 és 200 µg/ml dózisu trastuzumabbal, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5 és 1.7 µM koncentrációjú 17-AAG-vel, valamint a 17-AAG összes dózisát a klinikumban alkalmazott 40 µg/ml koncentrációjú trastuzumabbal kombinálva kezeltük. Az első nap után még 3 napon át naponta kezeltük mintáinkat, melyeket 37 °C-on 5% CO₂ tartalmú inkubátorban tartottunk, majd a sejteket feltripszinezttük és jelöltük.

4.4 Az ErbB2 expresszió és foszforiláció áramlási citometriás meghatározása

Az ErbB2 expresszió és foszforiláció meghatározásához a sejteket feltripszinezttük, a tripszin aktivitását 10% FCS tartalmú médiummal állítottuk le. Háromszor mostuk a sejteket 10 mM Hepessel pufferelt sóoldatban (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glükóz, pH 7,4; továbbiakban HBS), melynek során a centrifugálást 7 percig 600 g-vel végeztük. A mosott sejtszuszpenziót két részre osztottuk: az egyik részt a háttér meghatározásához, míg a másik részt a következőkben leírt jelölésekhez használtuk fel. Az extracelluláris ErbB2-t 20 µM Cy5-2C4-el jelöltük 10 percig 4 °C-on, a jelöléshez mintánként 8×10^5 sejtet használtunk 100 µl-ben. HBS-es mosást követően, a mintákat 300 µl 1% formaldehidben fixáltuk 20 percen át 4°C-on. Az intracelluláris jelöléshez a sejtek membránját 1% zsírmentes tejport, 0.1% szaponint és 1 mM nátrium ortovanadátot tartalmazó pufferrel permeabilizáltuk, mely egyben a foszfatáz aktivitást is gátolta. Az inkubációt 20 percig szobahőn végeztük. Mosást követően a foszfo-ErbB2-t (P-ErbB2) 100 µl 10 µM AlexaFluor 488 konjugált Ab-18 antitesttel jelöltük 40 percen át szobahőn. Az antitestet 1% tejpor és 0.1% szaponin tartalmú oldatban hígítottuk. A mintákat mostuk és 500 µl 1%

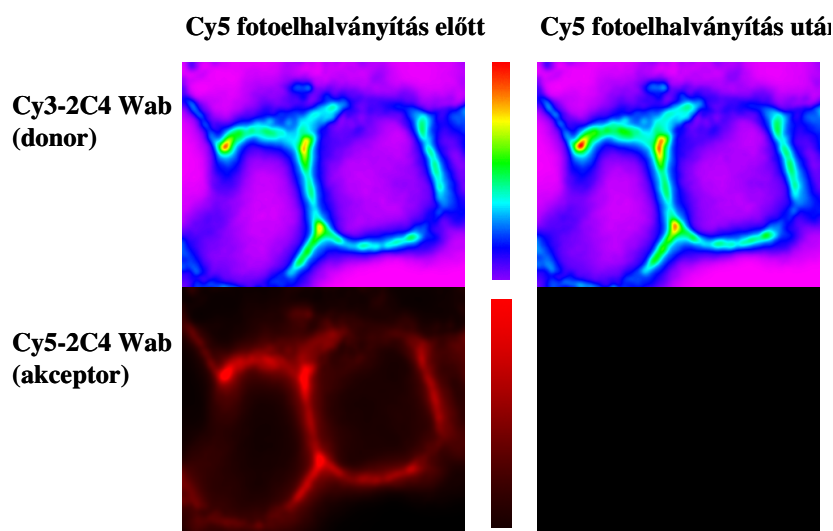
formaldehiddel fixáltuk. A sejtenkénti fluoreszcencia meghatározásához FACSCalibur típusú áramlási citométert (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) alkalmaztunk. A sejtszuszpenziót 488 nm-en, illetve 635 nm-en gerjesztettük, az emissziót 520 nm-es és 661 nm-es sávszűrő (FL1, FL4) segítségével detektáltuk. Mintánként 10,000 sejtet analizáltunk, a fluoreszcenciás jeleket logaritmikus erősítési módban vettük fel. Az egyes minták fluoreszcencia hisztogramjának középértékét a megfelelő háttér hisztogramjának középértékével korrigáltuk. Az ErbB2 expressziót az SKBR-3 sejtek ismert expressziós szintjére vonatkoztattuk, amelyet előzetesen 800,000-nek határoztunk meg QIFIKIT (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) segítségével, a gyártó leírása alapján.

4.5 Az ErbB2 homo- és heteroasszociációjának meghatározása

A homo- és heteroasszociációs kísérletekben az SKBR-3 és JIMT-1 sejteket 80%-os konfluenciában 12 mm átmérőjű fedőlemezekre növesztettük. A nedveskamrába kitett fedőlemezeken a sejteket mosást követően 7 percig 50 µl 40 µg/ml trastuzumab teljes antitesttel, 50 nM EGF-ral, illetve 2, 5 és 10 percen át 0.5 µM 17-AAG-vel kezeltük. Az ágenseket HBS-ben hígítottuk. A mintákat ezt követően jéghideg HBS-sel mostuk, majd 5 percig 1%-os formaldehiddel fixáltuk. Háromszori mosást követően a sejtek ErbB2-ErbB2 homodimerjeit 50 µl 20 µg/ml Cy3-2C4 donor-jelölt és 50 µl 20 µg/ml Cy5-2C4 akceptor-jelölt antitest elegyével jelöltük 10 percen át 4 °C-on. Az antitesteket 1% BSA tartalmú HBS-ben hígítottuk. Az ErbB1-ErbB2 heterodimer jelölését hasonló körülmények között végeztük, azonban donor antitestként Cy3-528-at alkalmaztunk a fent említett koncentrációban és mennyiségben. Végül a mintákat HBS-sel 3x mostuk és 5 µl Mowiolal (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 25 w/v% glicerol és 10% Mowiol 4-88, Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany) lefedve előtisztított mikroszkópos lemezre borítottuk.

A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) meghatározásához pozitív kontrollt is alkalmaztunk, ahol az ErbB2 két különböző epitópját jelöltük meg 50-50 μl 20 $\mu\text{g/ml}$ Cy3-2C4 és Cy5-4D5 antitesttel a fentiekkel azonos módon. Mivel ez a két antitest az ErbB2 két különböző epitópjához kötődik, közöttük elég jelentős (intramolekuláris) energiatranszfer várható.

A FRET hatásfok mérését akceptor fotoelhalványításos módszer segítségével határoztuk meg (Vereb és mtsai. 2004). A módszer lényege, hogy a donor emissziója lecsökken az akceptor fluorofór molekuláris közelsége miatt, azonban az akceptor fotoelhalványítása felszabadítja a donort a kioltás alól, minek következtében a donor fluoreszcencia intenzitása megnő (11. ábra).



11. ábra ErbB2 homodimerizáció mérése akceptor fotoelhalványítással: Ugyanazon mintán a Cy5-2C4 akceptor kiégetését (alsó sor, a vörös szín intenzitása a fluoreszcenciával arányos) követően az Cy3-2C4 donor (felső sor) intenzitása megnő. (A szivárvány színskála kéktől a vörösig a növekvő intenzitásokat jelöli.) Ennek az a magyarázata, hogy az akceptor kiégetésekor az általa indukált legerjesztődési folyamat megszűnik és a donor ezáltal fényesebben világít. Az akceptor jelenléte tehát csökkenti a donor emisszióját, mely csökkenés mértékéből a FRET hatásfok kiszámítható.

A FRET hatásfok, azaz E a mikroszkópos kép minden egyes pixelére kiszámítható az alábbi képlet segítségével:

$$E_{(i,j)} = 1 - \frac{F_{D(i,j)}^I}{\gamma \cdot F_{D(i,j)}^{II}}, \quad (1)$$

ahol $F_{D(i,j)}^I$ és $F_{D(i,j)}^{II}$ az akceptor elhalványítás előtti (I) és utáni (II) teljes kép ij -edik pixelének háttér korrigált donor fluoreszcencia értéke. A nevezőben megjelenő γ egy olyan korrekciós faktor, amely figyelembe veszi a donor elhalványulását a kiégetési procedura folyamán. Értékét a

$$\gamma = \left\langle F_{D(i,j)}^{ref,I} \right\rangle / \left\langle F_{D(i,j)}^{ref,II} \right\rangle \quad (2)$$

képlettel lehet megadni, ahol az $\left\langle F_{D(i,j)}^{ref,I} \right\rangle$ és az $\left\langle F_{D(i,j)}^{ref,II} \right\rangle$ a háttér-korrigált ij pixelenkénti donor intenzitás középértéke elhalványítás előtt (I) és után (II) egy olyan referencia minta küszöbérték feletti pixeleiben, melyet csak donorral jelöltünk és melyen azonos műszer beállításokkal az akceptor elhalványítási procedurát végigfuttattuk.

A FRET hatásfokot LSM 510 típusú konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) mértük Plan Apochromat 63x/1.4 NA oil DIC objektív alkalmazásával. A Cy3-at 543 nm-en, a Cy5-öt 633 nm-en HeNe lézer segítségével gerjesztettük, az előbbi 560-605 nm sávszűrőn, míg az utóbbit 650 nm felüláteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. 512x512 pixeles képeket vettünk fel maximálisan nyitott apertúra mellett. A csatornák közötti átvilágítás elkerülésére multi-track üzemmódot alkalmaztunk. A pixelenkénti FRET hatásfokot 2-5 sejtet tartalmazó képekből SCIL Image (TNO, Amsterdam, The Netherland) programkörnyezetben megírt kiértékelő program segítségével határoztuk meg.

4.6 A sejtprolifерáció meghatározása

A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk sejtprolifерációjára kifejtett hatását három különböző módszerrel határoztuk meg: sejtszámolással Bürker kamrában, valamint MTT- és EZ4U-teszt alkalmazásával. Mindhárom esetben 4 napon át naponta kezeltük mind a szenzitív, mind a rezisztens sejtvonalat a **4.3**-as pontnak megfelelő koncentrációkkal, triplikátumban. A kitapadt sejtek proliferációjának vizsgálatára legmegbízhatóbb módszernek

az EZ4U tetrazólium alapú teszt (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, Wien, Austria) bizonyult. A kezelést követően a lyukakhoz 20-20 µl hígított szubsztrát oldatot adtunk, ami a sejtek eltérő metabolitikus aktivitása miatt az SKBR-3 sejteken 6 órán át, míg a JIMT-1 sejteken 4 órán át maradt 37°C-os hőmérsékleten. Az abszorbanciát ELISA reader segítségével 450 és 620 nm-en mértük, majd a sejtszám pontos meghatározásához kiszámítottuk az OD^{corr} karakterisztikus paramétert az alábbi képlet segítségével:

$$OD^{corr} = OD_{450} - OD_{620} \cdot \frac{OD_{450}^{ref}}{OD_{620}^{ref}}, \quad (3)$$

ahol OD_{450} és OD_{620} a 450 és 620 nm-en mért tetrazólium kezelt minták optikai denzitása, míg az OD_{450}^{ref} és OD_{620}^{ref} az azonos sejtszámú jelöletlen kontroll mintákra jellemző denzitás. A sejtszám meghatározásához alkalmazott sejtszám függvényében ábrázolt OD^{corr} kalibrációs görbe elkészítésére a frissen kitett hígítási sejt sor 4 órás letapadását követően került sor. Ahhoz, hogy a sejtszám függvényében ábrázolt OD^{corr} egyenest adjon, az inkubációs időt mindkét sejtvonalnál optimalizáltuk.

4.7 Apoptózis vizsgálat

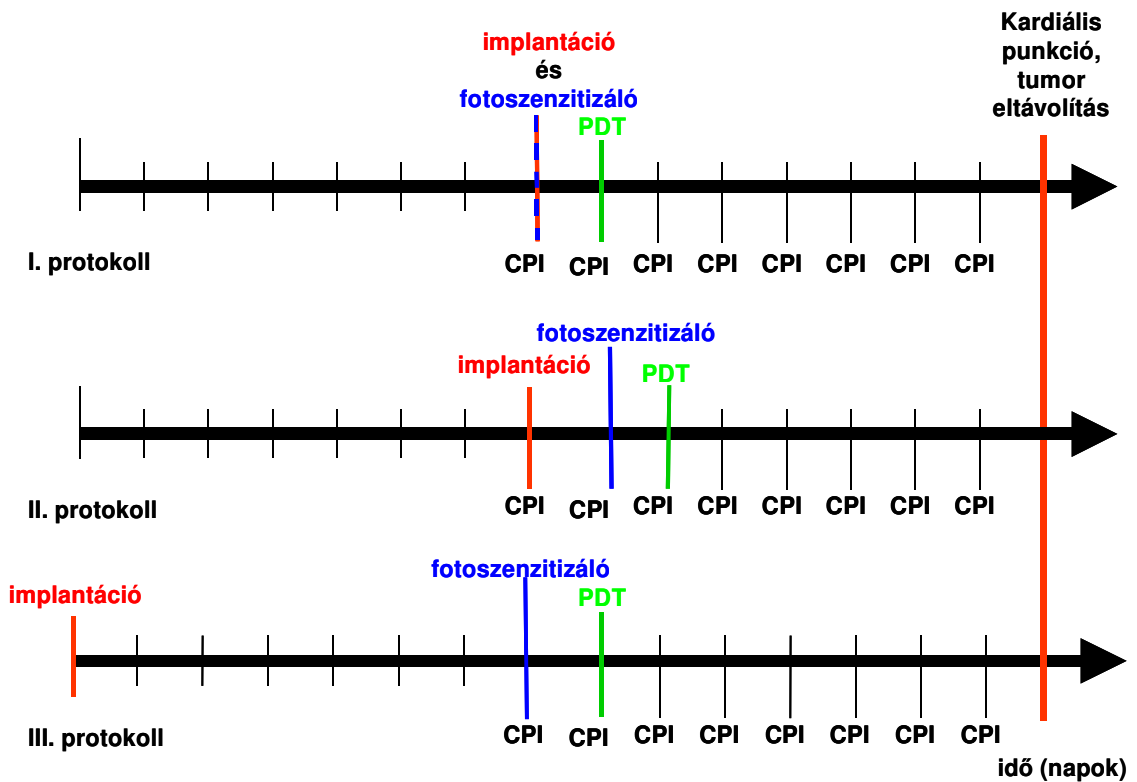
A 17-AAG-vel kezelt minták apoptózis vizsgálatát Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kittel (Sigma APO-AF) végeztük mind az SKBR-3, mind pedig a JIMT-1 sejtek esetében. 8-lyukú Nunc kamrába lyukanként 10^4 sejtet tettünk ki 400 µl indikátormentes médiumba. A sejtek letapadását követően a mintákat 0; 0.005; 0.05 és 0.5 µM 17-AAG-vel kezeltük 4 egymást követő napon. A kezelés 5. napján 400-400 µl kötő-puffert (100 mM HEPES/NaOH, 1.4 M NaCl és 25 mM $CaCl_2$, pH 7.5) adtunk a sejtekhez, ami 0.2 µM Annexin V-FITC-et és 0.8 µM propidium-jodidot tartalmazott. 10 perces szobahőn történő inkubáció után minden minta 3-3 véletlenszerűen választott területéről 9, 1 mm²-es területet lefedő összefüggő képet vettünk fel LSM 510 lézer pásztázó mikroszkóppal 40x/0.6 NA

objektívvel. A gerjesztést 488 és 543 nm-en végeztük, az emissziót pedig 505-555 és 560-605 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk, valamint rögzítettük a fáziskontraszt képet is. Az összes, az apoptotikus (Annexin-V-pozitív) és a nekrotikus (csak PI-pozitív) sejteket megszámláltuk, majd a teljes területre normalizáltuk.

4.8 A cisztatin (CPI) és a fotodinamiás terápia (PDT) kombinációja

A kezeléseket három különböző protokoll szerint végeztük (**12. ábra**). Az I. protokoll 0. napján az egerenkénti 1 ml homogenizált tumort 0.5 ml fiziológiás sóoldattal elegyítettük – mely oldat 500 µg CPI-t tartalmazott –, majd a patkányok hasának baloldali régiójába szubkután implantáltuk. Még ugyanezen a napon intraperitoneálisan 10 vagy 20 mg/testtömeg-kg koncentrációban HpD-t injektáltunk. Az 1. napon a normál és a tumoros szövet közé történő 500 µg CPI adását követően a tumort besugároztuk. Az elkövetkezendő 6 napos periódus minden egyes napján CPI-t kaptak állataink a fentiekben leírt módon. 8 napos kezelést követően az utolsó napon (7. nap) a Biomerk hatóanyaggal elaltatott patkányok tumorát eltávolítottuk, majd kardiális punkcióval Eppendorf csövekbe 200-200 µl-nyi vért gyűjtöttünk össze, amit 2 órán át szobahőn hagytunk megalvadni. A 10 percig tartó 1000 g-vel lecentrifugált minták szérumát külön Eppendorf csövekbe téve -70°C-on tároltuk a VEGF szint meghatározásáig. Az eltávolított, formaldehid-fixált, paraffinba ágyazott tumorokat 4 µm-es szeletekre vágtuk, majd hematoxilin-eozinnal megfestettük. A nekrozis mértékét fénymikroszkópos vizsgálattal (Olympus BX40) állapítottuk meg.

Az I.-höz képest a II. protokoll abban tért el, hogy a HpD-t egy nappal később injektáltuk, majd újabb 24 óra múlva besugároztuk. A III. módszernél fotoszenzitizálóként Ce6-ot alkalmaztunk (ez önmagában a HpD-val azonos hatást vált ki), a kezelést pedig 1 héttel a tumor implantációt követően kezdtük el.



12. ábra Az alkalmazott PDT-CPI kombinált protokollok időrendje: Az I. protokoll során a tumor implantációval egyidőben történt a fotoszenzitivizáló és a CPI adása, majd 24 óra múlva a besugárzás és egy héten át naponta CPI kezelés. A II. protokoll esetében az implantációval egyidőben csak a CPI adása történt, a kombinált kezelés további részét egy nappal később kezdtük. A III. protokollnál az implantációt követő 1 héttel kezdtük a kezelést.

4.9 Szövetteni metszetek elemzése

A nekrozis mértékét minden egyes minta esetén 4-4 db, 4 µm-es, paraffinba ágyazott, hematoxin-eozinnal festett teljes metszetből határoztuk meg 200x-os nagyítás mellett. A sejtek számlálását követően a roncsolt sejtek arányát a mindenkori patológiás kritériumoknak megfelelően százalékban kifejezve adtuk meg. Elhalt sejteknek vettük a kóros nukleáris (piknózis, kariorexis, kariolízis), illetve citoplazmatikus (koaguláció, elfolyósodás) morfológiát mutató sejteket, mint például az apoptotikus jellegű, intenzíven jelölődött összezsugorodott magot körülvevő tömör citoplazmával bíró sejteket. A vérerek számát 10x-es nagyítás mellett három különböző látótérben számoltuk meg, majd átlagoltuk.

4.10 Patkány szérum VEGF tartalmának meghatározása

A VEGF szintet a Quantikine kittel (R & D Systems GmbH, Germany, Cat# MMV00) a gyártó leírása alapján határoztuk meg. A mintákat 5-szörösére hígítottuk RD5T nevű kalibrátor oldattal. A VEGF-re specifikus poliklonális antitesttel bevont 96-lyukú mikroplébe lyukanként 50-50 µl fehérje alapú puffer hígítót tettünk, melyhez az előzetesen kihígított standard kalibrációs sor (0; 7; 8; 15.6; 31.2; 62.5; 250 és 500pg/ml) oldatainak, valamint a mintáknak 50-50 µl-ét adtuk. 2 órás inkubálást és ötszöri mosást követően a VEGF-re specifikus peroxidáz-konjugált poliklonális antitestből 100 µl-nyit adtunk lyukanként, majd ismét 2 órán át inkubáltuk, és ötször mostuk a mintát. Ezt követően 50 µl stabilizált hidrogén-peroxidot és 50 µl stabilizált kromogént (tetrametilbenzidin) adtunk a lyukakhoz, és 30 perc múlva, sósavas leállítás után 450 nm-es hullámhosszon mértük az optikai denzitást ELISA olvasóval.

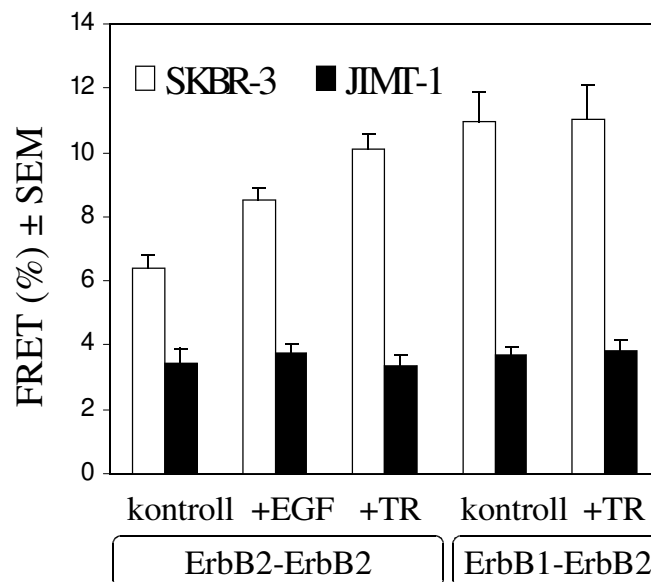
4.11 Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai értékeléséhez az SPSS programot (v.11.0) használtuk. A csoportok közötti összehasonlítást variancia analízissel (ANOVA) végeztük, melyet páronkénti t-próba követett. A normális eloszlást nem követő adatokat rang szerinti, egy- ill. kétszemponitű variancia analízissel elemeztük, melyet a kontrolltól való eltérések megállapítására páronkénti Wilcoxon rang szerinti összevetés követett (Holm-Sidak módszer). Az egyes paraméterek közötti korrelációt Pearson féle korrelációs koefficienssel jellemeztük. A dózis hatásgörbék illesztését Sigmaplot programmal végeztük.

5. Eredmények és megbeszélés

5.1 Az SKBR-3 és a JIMT-1 sejtek ErbB2 dimerizációja és aktivációja

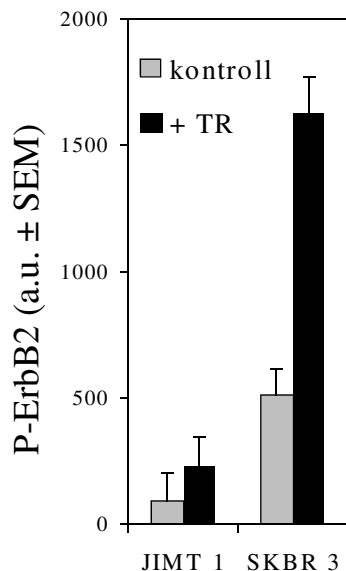
Tekintve, hogy a receptor tirozinkinázok aktivációja a receptorok dimerizációját, ill. oligomerizációját követően jön létre, vizsgálatainkat az ErbB2 homo- és heterodimerek tanulmányozásával kezdtük (**13. ábra**). Immunfluoreszcens jelölést követően a dimerek közötti fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfert az akceptor elhalványításos FRET mikroszkópos változatával határoztuk meg. A JIMT-1 sejteknél az ErbB2-ErbB2 homoasszociáció nagyon alacsony, és 50nM EGF, illetve 40 μ g/ml trastuzumab kezelésre sem változik.



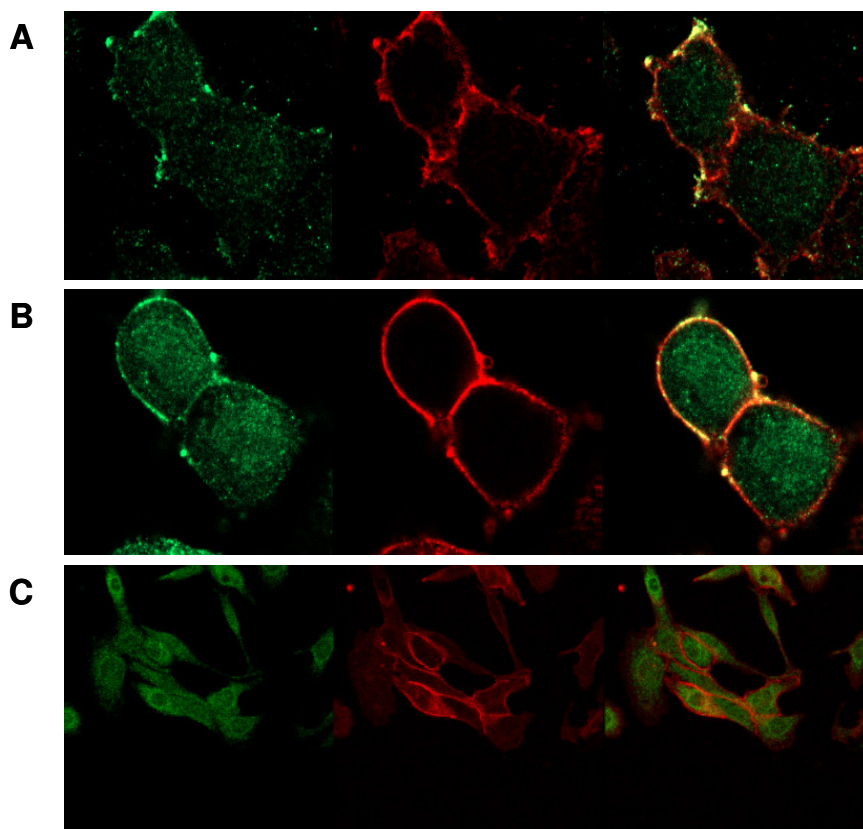
13. ábra A trastuzumab-rezisztens és szenzitív sejtek ErbB2 receptoraiak dimerizációja: Az ErbB1-ErbB2 és az ErbB2-ErbB2 dimerek között a FRET hatásfokot mikroszkópos akceptor-elhalványításos módszerrel mértük nyugalmi állapotban, illetve 7 perces 50 nM EGF vagy 40 μ g/ml trastuzumab kezelést követően. (>5 egymástól független mérés átlaga \pm S.E.M.)

Ezzel ellentétben az SKBR-3 sejtek ErbB2 homoasszociációja jelentős, melyet mind EGF mind pedig trastuzumab adással fokozni lehet. Az ErbB1-ErbB2 heteroasszociáció szintén nagyfokú a trastuzumab szenzitív sejteken, mértéke a rezisztens sejtvonalon a homodimerizáció mértékével egyezik meg. A trastuzumabnak egyik sejtvonal ErbB1-ErbB2 heterodimerjére sincs hatása, ami koherens azon legújabb felfedezéssel, miszerint

trastuzumab-konjugált paramágneses mikrogyöngyökkel történő lokális stimuláció sem serkenti – az ErbB1 foszforiláció mértékéből ítélve – az ErbB1-ErbB2 heterodimer kialakulását (Friedlander és mtsai. 2005). Áramlási citometriás méréseink szerint a JIMT-1 sejtek alacsony ErbB2 dimerizációs szintje párhuzamos ugyanezen receptor foszforilációjának alacsony szintjével, mely foszforilációs szint csak csekély mértékben növekszik 40 µg/ml trastuzumab adására (**14. ábra**). Az SKBR-3 ErbB2 specifikus tirozin foszforilációja jelentősebb, trastuzumab kezelés hatására pedig háromszorosára emelkedik. In situ immunfluoreszcens jelölést követő áramlási citometriás méréseink foszforilációra vonatkozó adatai jól korrelálnak a Western blot mérésekkel (Nagy és mtsai. 2005). Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készült képeinken jól látható, hogy az SKBR-3 sejtvonal jelentős ErbB2 foszforilációja feltűnően nagyfokú a sejtek adhézión pontjaiban, valamint egymással érintkező membránjaiban (**15. ábra**). A képek utolsó oszlopa az ErbB2, illetve foszfo-ErbB2 átfedését mutatja a sejt fedőlemezhez kitapadt (**15. A ábra**) részén, valamint középmagasságában készült optikai szeleten (**15. B ábra**). Az átfedés (sárga foltok) egyenetlen eloszlása is mutatja, hogy az adhézión jelenségek a lokális ErbB2 koncentrációtól függetlenül szabályozhatják az ErbB2 foszforilációt. Hasonló jelölést követően a JIMT-1 sejteken nem láttunk számottevő foszfo-ErbB2 jelölődést a membránban (**15. C ábra**).

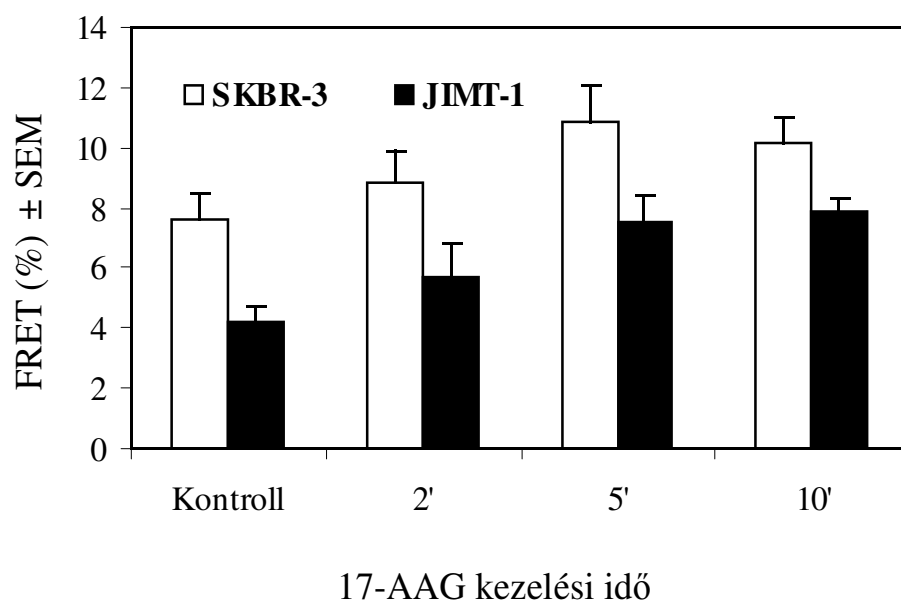


14. ábra Áramlási citométerrel mért alap és trastuzumab-indukált (7 perc, 40 µg/ml) ErbB2 foszforiláció JIMT-1 és SKBR-3 sejteken (3 egymástól független mérés átlaga ± S.E.M.)



15. ábra Az SKBR-3 és JIMT-1 sejteken kifejeződő ErbB2 receptor, valamint annak foszforilált formája: Az ErbB2 (vörös) Cy3-2C4 antitesttel direktén jelölt fehérje, míg foszforilált formája (zöld színű) Ab-18-cal és AlexaFluor 488-GAMIG-gal indirektén jelölt. Az ErbB2 és foszforilált formájának átfedését sárga szín jelzi. (A) SKBR-3 sejt lemezre kitapadt részének optikai szelete. (B) Ugyanezen sejt egy optikai szelete középmagasságban. A képek 48 x 48 µm-es területről készültek. (C) JIMT-1 sejtek csoportján látható az ErbB2 heterogén membrán kifejeződése, és az, hogy a P-ErbB2 jelölődése a membránban elhanyagolható. A kép 208 x 208 µm-es területről készült.

A következő lépésben azt szeretnénk volna eldönteni, hogy a Hsp90 gátlása 17-AAG-vel megváltoztatja-e a JIMT-1 sejtek alacsony ErbB2 dimerizációs és aktivációs állapotát. Ahogyan a **16. ábra** is szemlélteti, 0.5 μ M 17-AAG mindkét sejtvonal esetében hasonlóan, időfüggő módon növeli az ErbB2 homoasszociációt: 5 perces kezelésnél éri el a maximális FRET határfokot, ami 10 perces kezelést követően már alig változik. Munkacsoportunk eredményei szerint a rezisztens sejtvonal esetében a trastuzumab csökkent hatékonyságának oka lehet az ErbB2 trastuzumab-kötő extracelluláris epitópjának maszkírozása (Nagy és mtsai. 2005), azonban az ErbB2 teljes mértékben működőképes és a sztérikus gátlás leküzdésével aktiválható, pl.: a trastuzumab magas lokális koncentrációjával (Friedlander és mtsai. 2005). Ennek megfelelően az intracellulárisan ható 17-AAG képes az ErbB2 dimerizációját a sztérikus viszonyoktól függetlenül megindítani mind a rezisztens, mind a szenzitív sejtvonal esetén.



16. ábra A JIMT-1 és SKBR-3 sejtek ErbB2 homodimerizációjának megváltozása 2, 5 és 10 perces 17-AAG (0.5 μ M) kezelést követően: (Akceptor fotoelhalványításos mikroszkópos mérés, >5 egymástól független mérés átlaga \pm S.E.M.)

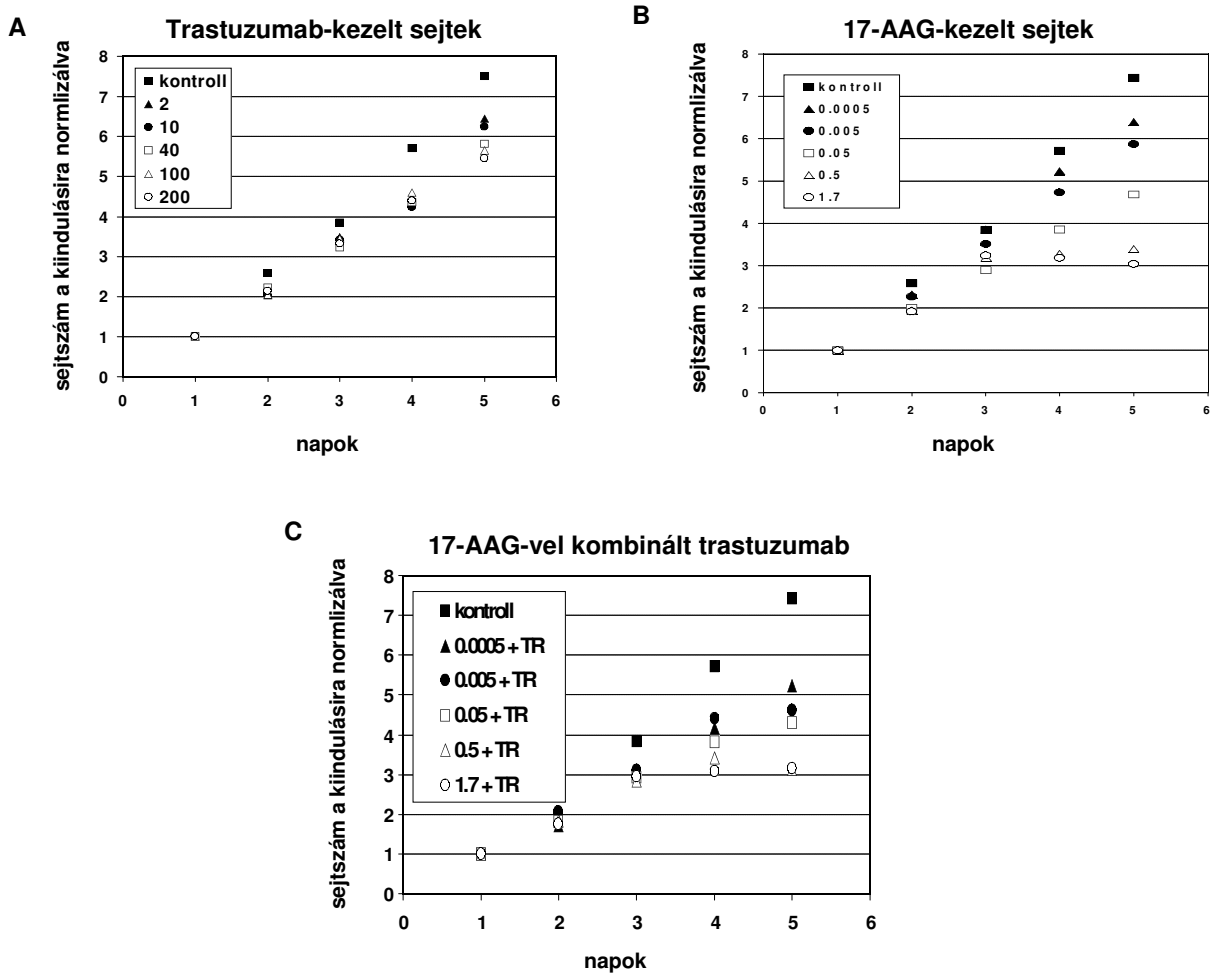
A hatásmechanizmust illetően azok a korábbi eredmények (Citri és mtsai. 2004) iránymutatóak, miszerint a Hsp90 nemcsak az ErbB2 helyes konformációjának kialakításában és fenntartásában játszik szerepet, de egyszersmind az ErbB2-höz kötődve azt inaktív állapotban tartja. Emiatt valószínűsíthető, hogy a Hsp90 17-AAG általi gátlása az ErbB2 felszabadulásához vezet, ami a receptor dimerizációs készségének és aktivációjának fokozódását eredményezi. A tény, hogy a 17-AAG előmozdítja az ErbB2 aktivációját és internalizációját mind az SKBR-3, mind pedig a trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteknél, arra a lehetőségre irányítja a figyelmet, hogy a Hsp90 gátlás segítségével az ErbB2 mindkét sejtneél leszabályozható lehet, ami eredményezheti a sejtproliferáció gátlását.

5.2 A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk hatása a sejtek proliferációjára

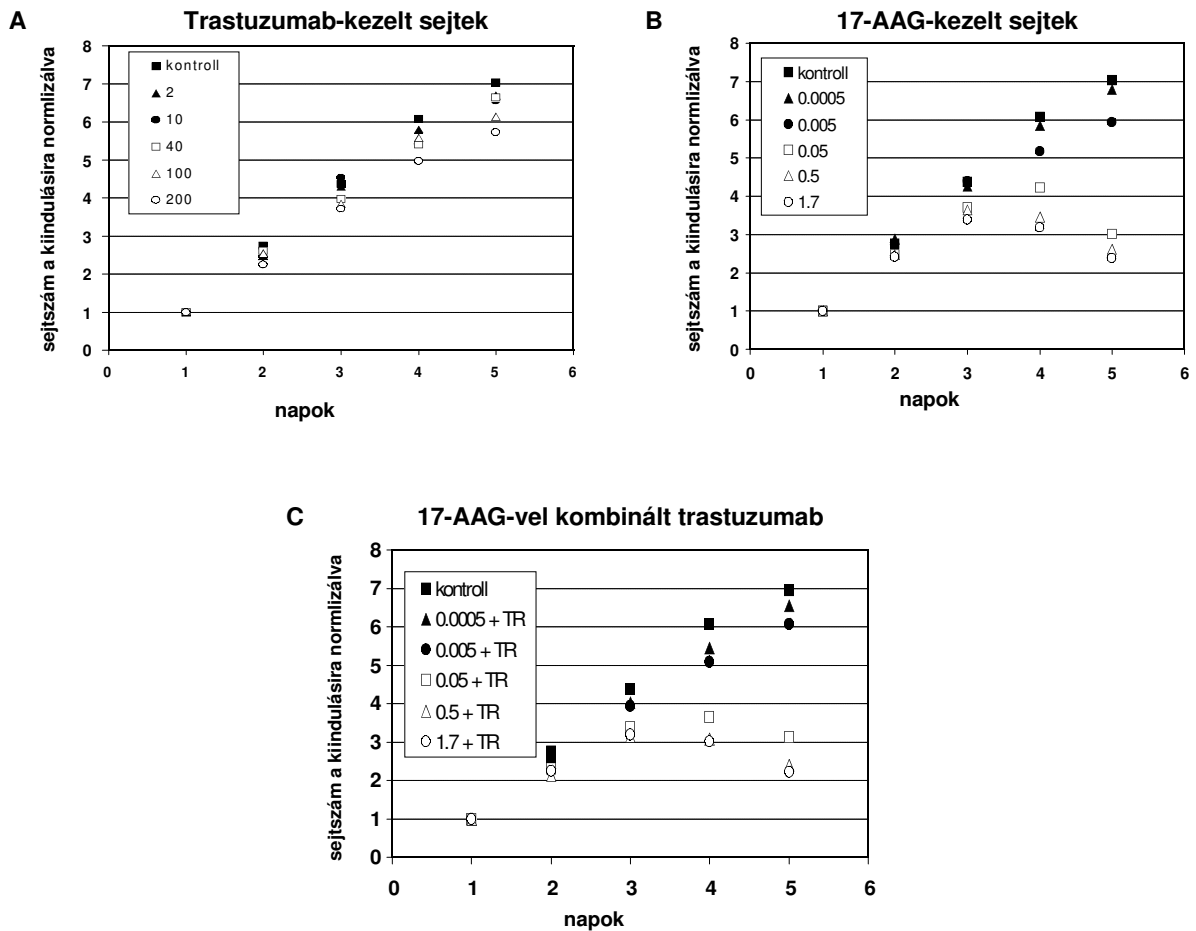
A fentiek fényében a továbbiakban a két sejtvonal proliferációját vizsgáltuk: Dózis-hatásgörbét készítettünk trastuzumab, 17-AAG, illetve kombinációs kezelést követően. A trastuzumabot 2-200 $\mu\text{g/ml}$, míg a 17-AAG-t 0.0005-1.7 μM koncentrációban naponta adtuk a sejtekhez 4 egymást követő napon át. Az SKBR-3 sejteknél kevesebb, mint 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú trastuzumab (**17.A ábra**) és kevesebb, mint 0.05 μM 17-AAG (**17.B ábra**) is elegendő ahhoz, hogy a sejt proliferációját már a 3. naptól kezdve gátolja. Az SKBR-3 sejtek kombinációs kezelésénél csak a kisebb 17-AAG koncentrációk (0.0005 és 0.005 μM) hatását (**17.C ábra**) növelte a 40 $\mu\text{g/ml}$ -es trastuzumab, a nagyobb dózisokra nem volt jelentősebb befolyással.

Várakozásainknak megfelelően a 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú trastuzumabnak elhanyagolható hatása van a JIMT-1 sejtvonalra; az SKBR-3-mal összehasonlítva még a 200 $\mu\text{g/ml}$ -es dózis is kevéssé befolyásolja a sejtek proliferációját (**18.A ábra**). A 0.05 μM 17-AAG azonban erősebben gátolja a JIMT-1 sejtek növekedését, mint az SKBR-3 sejteket (**18.B ábra**). Ennek alapján felvethető, hogy a 17-AAG valószínűleg sikerrel alkalmazható

önmagában az ErbB2-pozitív, de trastuzumab-rezisztens emlőtumorok kezelésére. A kezelés 40 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal történő kiegészítése nem változtatott jelentősen a 17-AAG proliferációt gátló hatásán (18.C ábra).



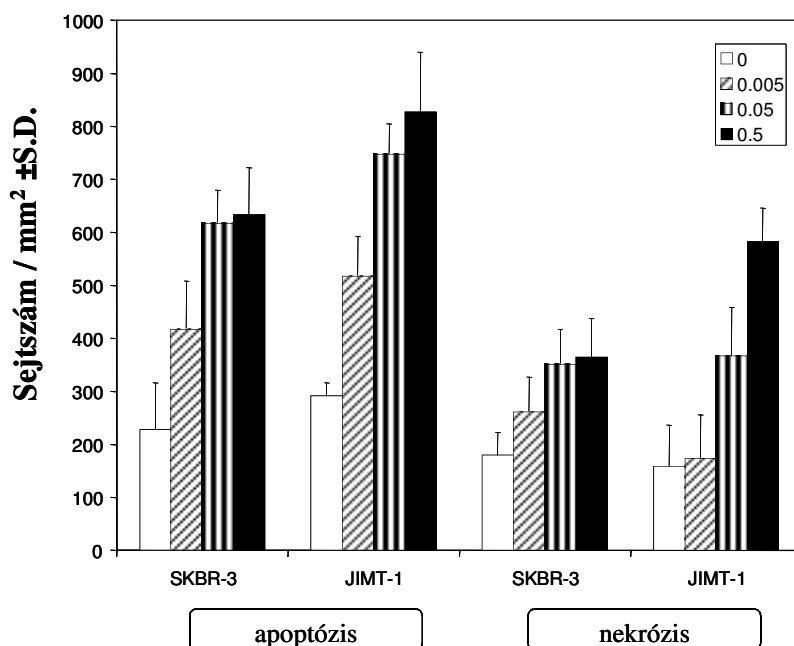
17. ábra Az SKBR-3 sejtek proliferációjára kifejtett trastuzumab, 17-AAG és kombinációs hatás: Tetrazólium alapú kolorimetriás tesztből meghatározott sejtszám a kezdeti sejtszámmra normalizálva (3 független mérés átlaga) (A) Naponta kezelés 0 (■), 2 (▲), 10 (●), 40 (□), 100 (△) és 200 (○) $\mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal. (B) Naponta kezelés 0 (■), 0.0005 (▲), 0.005 (●), 0.05 (□), 0.5 (△) és 1.7 (○) μM 17-AAG-vel. (C) Naponta kezelés 0 (■), 0.0005 (▲), 0.005 (●), 0.05 (□), 0.5 (△) és 1.7 (○) μM 17-AAG és 40 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumab kombinációjával.



18. ábra A JIMT-1 sejtek proliferációjára kifejtett trastuzumab, 17-AAG és kombinációs hatás: Tetrazólium-alapú kolorimetriás tesztből meghatározott sejtszám a kezdeti sejtszámmra normalizálva (3 független mérés átlaga) (A) Naponta kezelés 0 (■), 2 (▲), 10 (●), 40 (□), 100 (△) és 200 (○) µg/ml trastuzumabbal. (B) Naponta kezelés 0 (■), 0.0005 (▲), 0.005 (●), 0.05 (□), 0.5 (△) és 1.7 (○) µM 17-AAG-vel. (C) Naponta kezelés 0 (■), 0.0005 (▲), 0.005 (●), 0.05 (□), 0.5 (△) és 1.7 (○) µM 17-AAG és 40 µg/ml trastuzumab kombinációjával.

5.3 A 17-AAG dózisfüggő apoptozist és kismértékű nekrozist okoz

A 17-AAG által kifejtett antiproliferatív hatását háttérének tisztázására az előidézett nekrozis, illetve apoptózis mértékét az Annexin-V és propidium-jodid (PI)-pozitív sejtek arányából határoztuk meg 0.005; 0.05 és 0.5 µM 17-AAG-vel történő 4 napos kezelést követően (19. ábra).



19. ábra A 17-AAG által kiváltott apoptózis és nekrosis dózisfüggése: A 4 napos kezelés 0, 0.005; 0.05 és 0.5 μM 17-AAG-vel történt SKBR-3 és JIMT-1 sejteken. Az annexin-V-tel jelölődött sejteket apoptotikusnak, a csak PI-dal jelölteket nekrotikusnak tekintettük (3 független mérés átlaga \pm S.D.).

A PI-pozitivitástól függetlenül a membránjukban Annexin-V-tel jelölődött sejteket apoptotikusnak, míg a csak PI-dal megfestődötteket nekrotikusnak tekintettük.. A 17-AAG dózisfüggően növeli az apoptózis, illetve a nekrosis mértékét, melyek közül mindkét sejtvonal esetében az apoptózis dominál.

5.4 A sejtek proliferációjának, ErbB2 szintjének és ErbB2 foszforilációjának dózisfüggő változása 17-AAG hatására

A 17-AAG proliferációt gátló félhatásos dózisának (IC_{50}) meghatározásához a sejteket 4 napon át kezeltük 0.0005-1.7 μM koncentrációjú 17-AAG-vel önmagában, illetve 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trastuzumabbal kombinálva. Az 5. napon a lyukankénti sejtszámot tetrazólium alapú kolorimetriás teszt segítségével határoztuk meg, míg a sejtek felszínén kifejeződő ErbB2 és foszfo-ErbB2 molekulák mennyiségét áramlási citométerben mértük. A mért paraméterek dózis-hatásgörbéje tipikus szigmoid lefutású (**19.A és B ábra**), melyből a Hill-egyenlet alkalmazásával az IC_{50} értéke meghatározható (**1. táblázat**).

<u>IC₅₀</u>	<u>proliferáció</u>		<u>ErbB2 szint</u>		<u>P-ErbB2 szint</u>	
	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>	<u>SKBR-3</u>	<u>JIMT-1</u>
	0.069 ±	0.011 ±	0.029 ±	0.028 ±	0.044 ±	0.036 ±
17-AAG, μM	0.011	0.003	0.001	0.002	0.007	0.009
17-AAG, μM	0.086 ±	0.018 ±	0.022 ±	0.08 ±	0.331 ±	0.031 ±
(+TR)	0.063	0.004	0.002	0.013	0.090	0.008

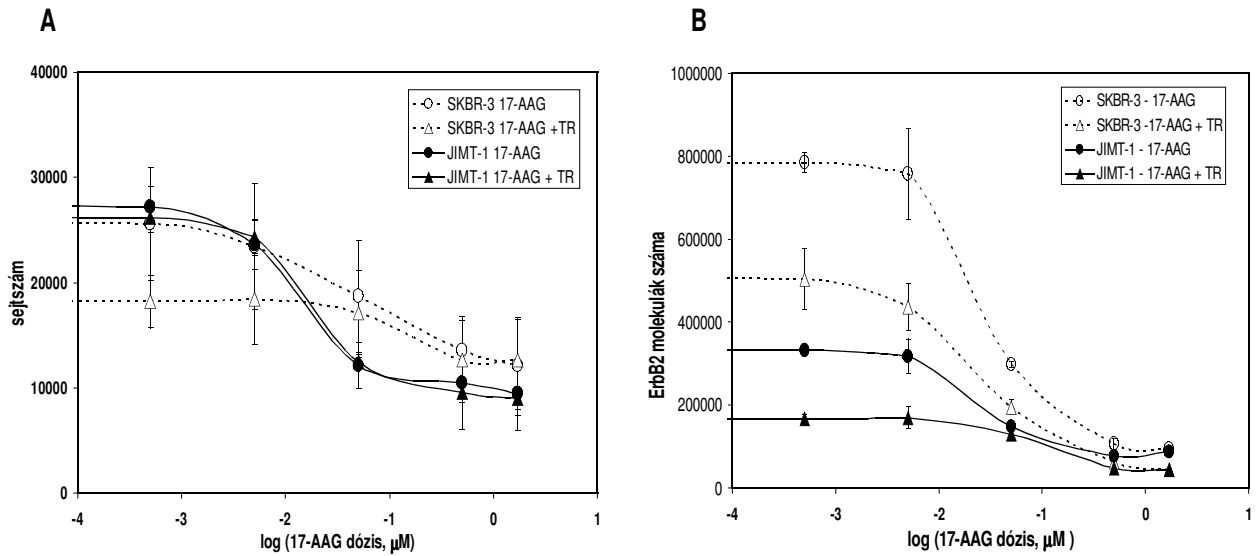
1. táblázat A 17-AAG félhatásos dózisa (IC₅₀) önmagában, és trastuzumabbal kombinációban: A Hill-egyenlettel illesztett dózis-hatásgörbék IC₅₀ értékei (3 független mérés átlaga ± S.D.), R²>0.995. +TR jelöli a 40 μg/ml trastuzumab adását.

A trastuzumab önmagában nem befolyásolja a JIMT-1 sejtek proliferációját, ahogyan azt a klinikai tapasztalatoknak (Tanner és mtsai. 2004) megfelelően várjuk, de az SKBR-3 sejtek növekedését 2-200 μg/ml koncentrációs tartományban gátolja (**17.A és 18.A ábra**). 17-AAG kezelésre azonban a JIMT-1 sejtek még az SKBR-3-nál is érzékenyebbek, amit a félhatásos dózis 0.011 μM-os értéke (**20.A ábra**) jelez az SKBR-3 0.069 μM-os IC₅₀ értékéhez képest. A 17-AAG antiproliferatív hatása 0,005 és 0,05 μM között erősödik legkifejezettebben, 0,5 μM fölött pedig már nem fokozódik tovább. Az 17-AAG 40 μg/ml trastuzumabbal történő kiegészítése JIMT-1 esetén csekély mértékű IC₅₀ növekedést idézett elő (**1. táblázat**). Az SKBR-3 proliferációját tekintve a 17-AAG félhatásos dózisa nem változik jelentős mértékben trastuzumab adására, alacsony 17-AAG koncentrációknál azonban – ahol a chaperon inhibitor hatása még kicsi – a 40 μg/ml trastuzumab nagyfokú csökkenést idéz elő a proliferációban az önmagában alkalmazott 17-AAG kezeléshez viszonyítva (**20.A ábra**).

A **20.B** ábrán látható, hogy a két sejtvonalnál az ErbB2 sejtfelszíni mennyisége egyforma mértékben csökken a 17-AAG növekvő koncentrációjával, az IC₅₀ értéke mindkét esetben ~0.03 μM. Az is kitűnik, hogy a kezeletlen JIMT-1 sejtek ErbB2 molekuláinak száma kb. fele az SKBR-3 sejtekének, ami jól korrelál korábbi adatokkal (Friedlander és

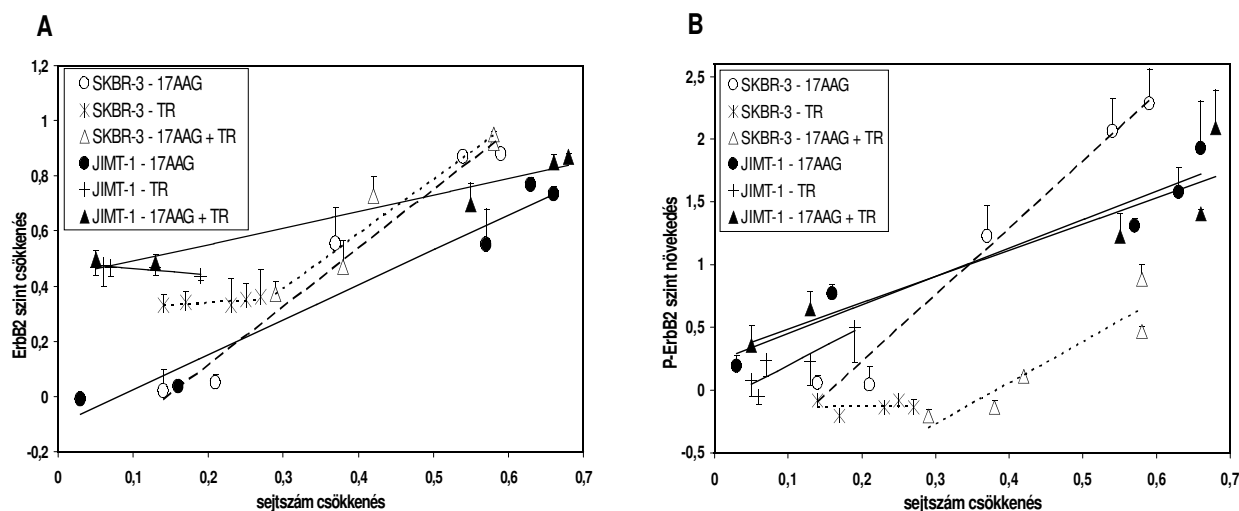
mtsai. 2005; Nagy és mtsai. 2005) és Western blot eredményekkel. Az SKBR-3 esetében a 40 µg/ml trastuzumab elhanyagolható hatással van a 17-AAG IC₅₀ értékére, a JIMT-1-nél azonban több mint kétszeresére nő a félhatásos dózis értéke (**1. táblázat**). Megállapítható, hogy a JIMT-1 esetén a trastuzumab az ErbB2 leszabályozásában is mérsékli a 17-AAG hatását, tehát trastuzumab-rezisztens sejtek esetén nem javasolható a 17-AAG kezelés kiegészítése trastuzumabbal. A jelenség hátterében vélhetően az áll, hogy a kombinált kezelés során kialakuló eltérő foszforilációs mintázat az ErbB2 sejtmembránba történő visszakerülést elősegíti, s az azonnali degradáció mértékét csökkenti – ilyen jelenséget trastuzumab hatás során már megfigyeltek korábban (Austin és mtsai. 2004). Ha a trastuzumab önmagában kerül alkalmazásra, az csökkenti az ErbB2 sejtfelszíni mennyiségét nemcsak az SKBR-3, hanem érdekes módon a JIMT-1 sejteken is, de ez utóbbi esetben a hosszútávú leszabályozás nem jár együtt proliferáció gátlással.

A trastuzumab szenzitív SKBR-3 sejteknél a trastuzumab önmagában történő adagolása a foszfo-ErbB2 szint dózistól független enyhe mértékű csökkenését okozza (**21.B ábra**). A 17-AAG által előidézett jelentős mértékű ErbB2 downreguláció (**21.A ábra**) mellett az egyre nagyobb 17-AAG dózisok adásával a foszforilált ErbB2 szint mind az SKBR-3, mind pedig a JIMT-1 sejteknél fokozódik, ami alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a Hsp90 általi gátlás alól felszabaduló ErbB2 aktiválódik, majd internalizálódik. A félhatásos dózis értéke hasonló a két sejtvonalnál, azaz ~ 0.04 µM (**1. táblázat**). 17-AAG kezelés kiegészítése 40 µg/ml trastuzumabbal JIMT-1 sejtek foszfo-ErbB2 szintjét a 17-AAG által kiváltott hatáshoz képest nem változtatja meg. Ugyanakkor az SKBR-3 sejteknél nagyfokú foszforiláció csökkenést idéz elő, főként az alacsonyabb, azaz a 0.0005 és 0.005 µM 17-AAG dózisoknál. Eszerint trastuzumab hatására a 17-AAG ErbB2-foszforilációt elősegítő képessége trastuzumab szenzitív sejtekben csökken, amit a 17-AAG félhatásos dózisának nagyságrendnyi növekedése is mutat (**1. táblázat**).



20. ábra A 17-AAG hatása a sejt proliferációra és ErbB2 szintre önállóan és trastuzumabbal kombinálva: A kezelés 4 napon át naponta 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, és 1.7 μM 17-AAG-vel történt önállóan, vagy a jelölés szerint 40 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal kiegészítve. (3 független mérés átlaga \pm S.D.) (A) Az 5. napi sejtszám és (B) a sejtmembránban kifejeződő ErbB2 molekulák száma a 17-AAG koncentráció függvényében.

Érdekes az a megfigyelésünk, hogy bár a JIMT-1 sejtek proliferációjára nincs jelentősebb hatással a trastuzumab, az ErbB2 sejtfelszíni expresszióját lecsökkenti, foszforilációját pedig kismértékben növeli a dózis emelésével (**20.A és B ábra**). Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy a JIMT-1 sejteknek van egy olyan alpopulációja, melynek trastuzumab-kötő kapacitása jóval nagyobb az átlagosnál (Nagy és mtsai. 2005), és ezekben a sejtekből trastuzumab kezelés hatására az ErbB2 sokkal hatékonyabban eliminálódik a sejt felszínéről, ami az ErbB2 és P-ErbB2 szint mintaátlagát befolyásolja, de a teljes populáció proliferációjára nincs jelentős hatással.



21. ábra A trastuzumab, 17-AAG és kombinációjuk sejtszintű hatásainak összefüggései: A sejtek kezelése 4 napon át naponta 2, 10, 40, 100 és 200 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, és 1.7 μM 17-AAG-vel, valamint a különböző 17AAG koncentrációkat 40 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumabbal kiegészítve történt. A citosztatikus hatást a kontrollra normalizált relatív sejtszám csökkenés fejezi ki. (A) Az ErbB2 szint csökkenése a sejtszám csökkenés függvényében. ErbB2 szint csökkenés = $1 - (\text{ErbB2 szám kezelés után} / \text{ErbB2 szám a kezeltlen kontrollban})$. (B) Az ErbB2 foszforiláció növekedése a sejtszám csökkenés függvényében. P-ErbB2 szintnövekedés = $(\text{kontrollra normalizált P-ErbB2 értékek}) - 1$, a negatív értékek a kontrollhoz viszonyított foszforiláció csökkenésre utalnak.

5.4 A trastuzumab, a 17-AAG és kombinációjuk antiproliferatív hatása korrelál az ErbB2 számmal, valamint az ErbB2 foszforilációval

A továbbiakban a kezelések 5. napján meghatározott antiproliferatív hatás (kontrollra normalizált sejtszám csökkenés), a kontroll szintjére normalizált ErbB2 expresszió-csökkenés, valamint foszfo-ErbB2 szint emelkedés közötti korrelációt vizsgáltuk (**21.A és B ábra**). Mindkét sejtvonalnál a membrán ErbB2 szintjének csökkenése szignifikáns pozitív korrelációt ($R^2 > 0.8$, $p < 0.05$) mutat a 17-AAG antiproliferatív hatásával, függetlenül a trastuzumab jelenlététől, tehát elmondható, hogy *in vitro* a sejtmembránban található ErbB2 mennyisége a proliferáció fontos tényezője (**21.A ábra**). A trastuzumab önmagában a várakozásnak megfelelően gátolja az SKBR-3 sejtek proliferációját, s ezzel párhuzamosan ~40%-ra csökkenti az ErbB2 szintet. Ezzel összhangban a 17-AAG-val kezelt SKBR-3 sejtekhez adott trastuzumab eltolja az antiproliferatív hatás függvényében ábrázolt ErbB2 szintcsökkenést a nagyobb kezdő értékek felé, azonban a függvény meredekségét nem

változtatja meg. Annak ellenére, hogy a trastuzumab terápiás koncentrációban alig gátolja a JIMT-1 sejtek proliferációját, az SKBR-3 sejtekhez hasonlóan ErbB2 szintcsökkenést idéz elő. Ezzel összhangban, amikor 40 µg/ml trastuzumabot adunk a 17-AAG-vel kezelt JIMT-1 sejtekhez, az antiproliferatív hatás – ErbB2-csökkenés függvény kezdőpontja a jobban leszabályzott ErbB2 értékek irányába tolódik, de a sejtzámban bekövetkező relatív csökkenés szempontjából nem változik.

Mindkét sejtvonalnál pozitív korreláció ($R^2 > 0.85$, $p < 0.05$) áll fenn a foszfo-ErbB2 szintnövekedés és a 17-AAG antiproliferatív hatása között, függetlenül a 40 µg/ml trastuzumab jelenlététől (**21.B ábra**). Az ErbB2 szintcsökkenés és az ErbB2-foszforiláció növekedés szintén pozitívan korrelál mindkét sejtvonal esetében ($R^2 > 0.8$, $p < 0.05$, nincs ábrázolva). A trastuzumab önmagában enyhén fokozza a JIMT-1 sejtek ErbB2 foszforilációját a növekvő dózisok irányába, de a sejt szám csökkenés függvényében ábrázolt foszfo-ErbB2 szintnövekedés korrelációs egyenesét nem változtatja meg. Az SKBR-3 sejtek foszfo-ErbB2 szintjére a trastuzumab – dózisától függetlenül – csekély mértékű csökkentő hatást gyakorol. A 0.0005 és 0.005 µM 17-AAG-vel kezelt sejtekhez adott 40 µg/ml trastuzumab a 17-AAG önálló alkalmazásához képest jelentős csökkenést idéz elő az ErbB2 foszforilációjában, és az ettől nagyobb 17-AAG dózisoknál is észlelhető ez a hatás.

A pozitív korrelációk egyfelől alátámasztják, hogy az ErbB2 szint csökkentése antiproliferatív hatású, és azt is, hogy a fokozott ErbB2 foszforiláció serkenti az internalizációt. Ugyanakkor az a tény, miszerint a 17-AAG félhatásos dózisa az ErbB2 és P-ErbB2 szabályozásában a JIMT-1 és SKBR-3 sejtek esetén közel azonos, míg az antiproliferatív hatás szempontjából a magasabb ErbB2 expressziójú SKBR-3-nál magasabb, arra utal, hogy valószínűleg kettős hatással állunk szemben. Részben, a Hsp90-et gátolva, és ezzel az ErbB2 fehérje felszabadulását elősegítve az ErbB2 protein aktiválódik, majd leszabályzódik, részben pedig az aktivált ErbB2 olyan túlélési és proliferációs szignálokat

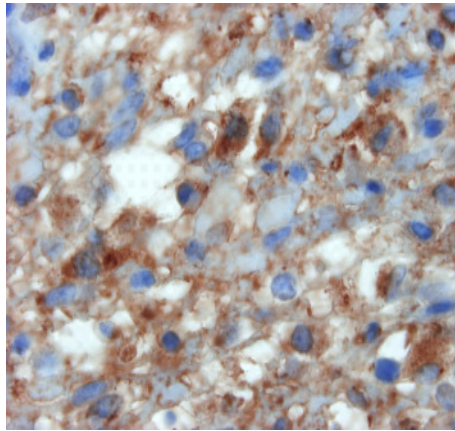
indít be, melyek feltehetőleg a PI3K/Akt és MAP kináz útvonalakon keresztül játszódnak le. Ilyen tumoroknál a trastuzumabbal történő kombináció hatásos lehet a 17-AAG által kiváltott ErbB2 foszforiláció gátlásában, valamint az alacsony dózisu 17-AAG növekedést gátló hatásának fokozásában.

Kísérletes bizonyíték igazolja, hogy az ErbB2 Hsp90-kötő helyének mutációja spontán ErbB2 aktivációt okoz, továbbá a sejtproliferációt is hatékonyabban fokozza az NIH-3T3 sejtekbe transzfektált vad típusú ErbB2-höz képest (Citri és mtsai. 2004). Így a 17-AAG antiproliferatív hatása feltehetőleg az ErbB2 fehérjén túl számos egyéb jelátvivő molekula leszabályzásának is köszönhető. Mi több, az olyan ErbB2-t túlzott mértékben kifejező sejteknél, mint pl. az SKBR-3 a Hsp90-től szabaddá vált ErbB2 erős túlélési és proliferációs szignál útján az alacsonyabb ErbB2 expressziójú (pl. JIMT-1) sejtekhez képest a 17-AAG IC₅₀ értékének növekedését okozhatja. Következésképpen a megemelkedett ErbB2 foszforiláció, továbbá a csökkent membrán ErbB2 szint ugyan a 17-AAG dózisu függő hatásának biztos jele, azonban a csökkent proliferációnak nem feltétlenül egyedüli oka.

5.5 A fotodinámiás terápia (PDT) és a cisztatin (CPI) kombinációjának nekrozist előidéző hatása patkány emlőkarcinómában in vivo

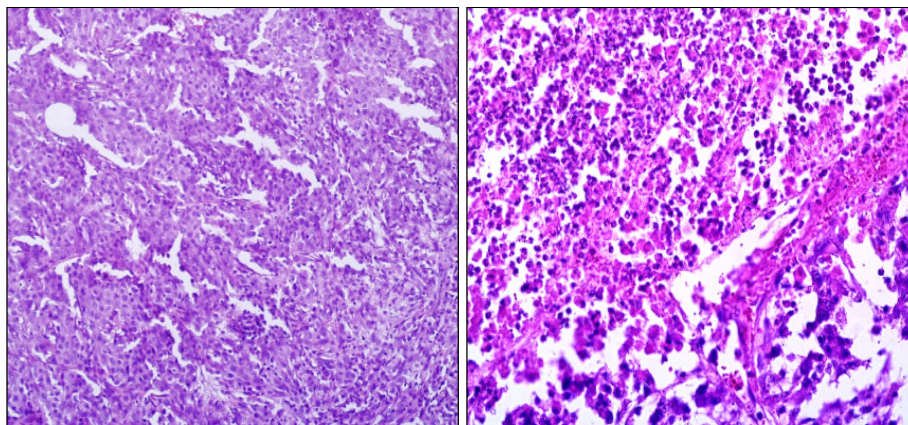
Állatkísérleteinkben a fotodinámiás és cisztein proteináz inhibitor terápia kombinációjának Wistar patkányokba implantálható szolid emlő adenokarcinómára kifejtett hatását vizsgáltuk. A daganatos betegek vérének megemelkedett VEGF szintje indokoltá teszi ezen faktor koncentrációjának redukálását, mivel a VEGF fontos szerepet játszik a neovaszkularizáció és angiogenezis folyamatában. Az ErbB2 fokozott mértékű kifejeződése a VEGF szint növekedéséhez vezet, amit a trastuzumab – ErbB2-t leszabályozó szerepéből kifolyólag – mérsékelni képes. Az általunk vizsgált emlőkarcinóma azonban csak csekély

mértékben ErbB2-pozitív (**22. ábra**), így a kombinációs kezeléshez egy tojásfehérjéből izolált cisztein proteináz inhibitor, a cisztatint választottuk.



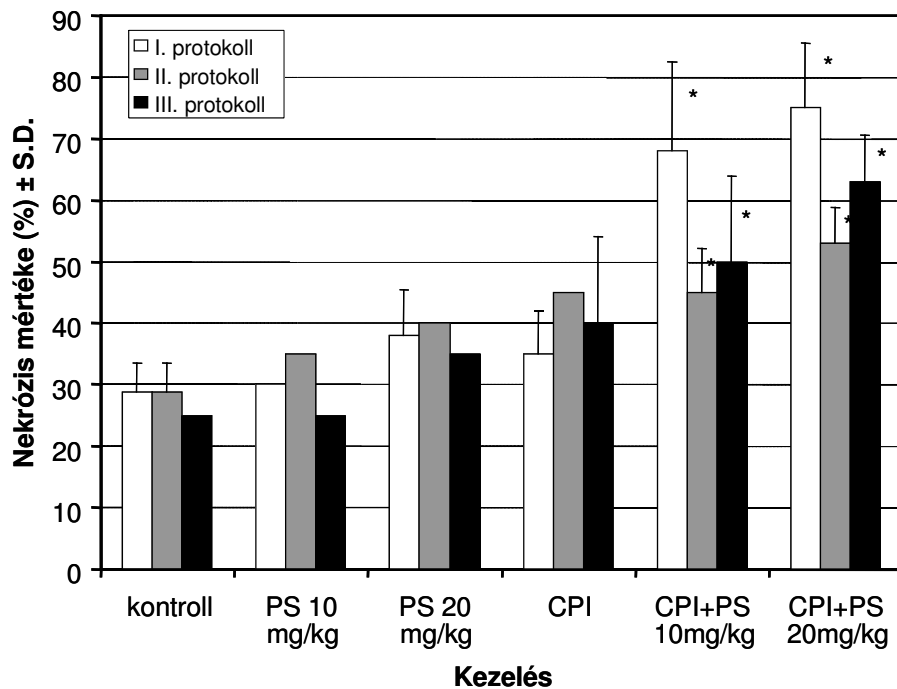
22. ábra A Wistar patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma a Herceptest eredménye alapján legfeljebb egykeresztes ErbB2-pozitivitást mutat. Herceptest: Dako Corporation; hematoxilin magfestés. A meghatározást Dr. Szöllösi Zoltán (DE OEC Patológiai Intézet) végezte.

A különböző kezelési protokollok közül a legígéretesebb eredményeket az egy héten át, naponta adott CPI-vel kombinált 20 mg/kg HpD-PDT terápiával (I. kísérleti protokoll) értük el. Ez a protokoll a kontroll ~28%-os nekrozisával szemben (**23.A ábra**) akár 90%-os tumor elhalást (**23.B ábra**) is eredményez. A CPI és a PS-PDT monoterápiák csekélyebb hatással voltak a nekrozis mértékére, 35-40%-os hatást értek el.



23. ábra Wistar patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma: (A) 25-30%-os nekrozis a kontroll, kezeletlen csoportból. (B) A tumor 85-90%-a nekrotizált 20 mg/kg HpD-PDT(90 J/cm² fény dózis) és 500 µg/patkány CPI kezelést követően. Hematoxilin-eozin festés, 200X.

A **24. ábra** a tumor nekrozis kvantitatív elemzését mutatja az egyes protokollok és dózis kombinációk esetén. Az I. kísérleti protokoll a legeredményesebb, ahol a tumor implantációval egyidőben történt a HpD és a CPI adása, majd 24 óra múlva a tumor besugárzása és 1 héten át naponta a CPI injektálása. A többi kísérleti protokoll kisebb mértékű nekrozishoz vezetett: úgy tűnik, a tumor gyors növekedése miatt leghatékonyabb az implantációval egyidőben történő CPI infiltráció. A II. kísérleti protokoll alkalmazásakor a kombinált kezelés, amely CPI tartalmú tumor-szuszpenzió implantációjából, majd 24 óra múlva HpD injektálásból, és további 24 óra múlva besugárzásból állt, a tumort kisebb mértékben roncsolta, mint az I. protokoll szerint végrehajtott kombinált kezelés. A III. protokoll, ahol a tumor implantáció után 1 héttel később kezdődött a kombinált kezelés, a tumorszövetet az I. protokollhoz képest szintén csekélyebb mértékben roncsolta ($p < 0.05$), noha a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékű elhalást okozott ($p < 0.001$). Ez a megfigyelés klinikai jelentőséggel bírhat, ugyanis a tumor eltávolítást közvetlenül követő CPI infiltráció PDT-val együtt alkalmazva (I. protokoll) a műtét során visszamaradt, vagy szóródott tumorsejtekben hatékonyabban fokozhatja a PDT nekrozist elősegítő hatását a később kezdett inhibitor injektáláshoz képest, ami a lokális recidívák és metasztázisok képződésének megakadályozását előmozdíthatja.



24. ábra A nekrozis kvantitatív analízise: A külön-külön alkalmazott PDT és CPI terápia a tumort mérsékelten nekrotizálja, ellentétben a kettő kombinációjával, amely sokkal hatékonyabb roncsolást eredményez. PS: fotoszenzitivizáló; CPI: cisztatin, *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest ($p < 0.001$).

Mind a kisebb, mind pedig a nagyobb dózisú PS-PDT CPI-vel kombinált terápia jelentős mértékben nekrotizálta a tumoros szövetet ($p < 0.001$) a kezeletlen mintákhoz képest. A kombinációs terápiaiban a magasabb dózisú fotoszenzitivizáló kismértékben fokozta a tumor nekrozist az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel összehasonlítva ($p = 0.06$). A PS-PDT és CPI monoterápiák esetében azonban a 10 mg/kg PS dózisnak nem volt jelentősebb hatása ($p = 0.58$), míg a 20 mg/kg dózis, a CPI-hez hasonlóan, mérhető nekrozis növekedést idézett elő ($p = 0.01$ és $p = 0.06$). Mindazonáltal bármelyik monoterápia hatékonysága lényegesen alacsonyabb akár a kisebb ($0.03 < p < 0.1$) akár a nagyobb ($p = 0.001$) dózisú fotoszenzitivizálóval történő kombináció hatékonyságánál. Mindkét PS dózisú PS-PDT CPI-vel kombinált terápia szinergisztikus volt. A kisebb dózisú 429, a nagyobb dózisú 200%-kal növelve a nekrozis mértékét a kombináció részeit képező monoterápiák által elért összegzett hatáshoz képest. (A kezelt minták értékeit a kezeletlen mintákra normalizálva a kezelés által okozott, 100% feletti nekrozis mértéke a 10 és 20 mg/kg PS, CPI és a kisebb, illetve a nagyobb dózisú PS

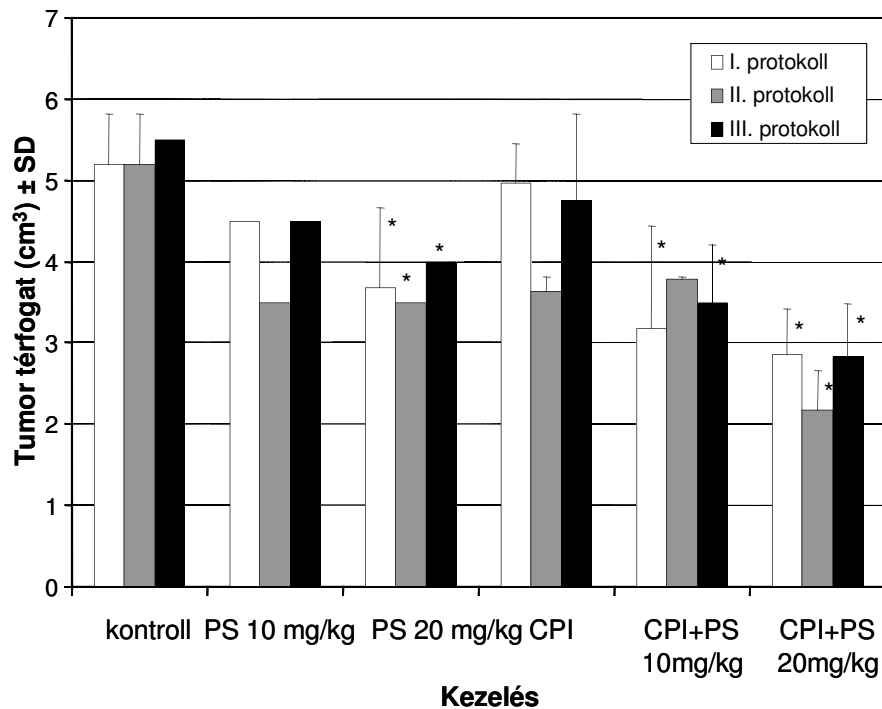
kombinációs terápiák esetén rendre: 4,17%, 31,94%, 21,53%, 136,11% és 160,42%. A komponensek összegzett hatása a kisebb dózisú PS és CPI esetén 25,69%, míg a nagyobb dózisú PS és CPI esetén 53,47%; ezen értékeknél a kombinált kezelések eredménye rendre 110,42%, illetve 106,94% -kal nagyobb, ami a 25,69%-os és 53,47%-os összegzett hatáshoz képest 429%-os, illetve 200%-os javulást jelent.)

A PS-PDT és a CPI szimultán terápiájának hatékonysága a HpD fényindukált aktivációjával, valamint a CPI által lecsökkentett katepszin, legumain és calpain aktivitással magyarázható. A fotoszenzitizálók lizoszómákban dúsulnak fel, és megfelelő fényforrással történő megvilágítást követően aktívan roncsolják a lizoszómát (Caruso és mtsai. 2004). Ez a folyamat mitokondriális sejthalálhoz vezet a Bid, a prokaspáz-9 és-3 aktivációján keresztül (Reiners és mtsai. 2002). A cisztein proteázok aktivitásának CPI általi gátlása ezzel a hatással szinergisztikus lehet. A katepszinnek fontos szerepe van a mátrix bontásában és a sejtek inváziójában, ami a tumor agresszivitását eredményezi (Joyce és mtsai. 2004). Az aszparagil endopeptidáz legumain a tumor sejtek invadopódiáján koncentrált membrán-kötött vezikulákban található, és a progelatináz aktiválásán keresztül az extracelluláris mátrix degradációját okozza (Liu és mtsai. 2003). Amennyiben a katepszin és legumain aktivitását CPI-vel redukáljuk, a peritumor sztrómába történő sejtinvázió gátlódik (Saleh és mtsai. 2003). A calpain gátlása szintén a migrációt csökkenti (Dedieu és mtsai. 2004). Az invázió és a velejáró vaszkularizáció hiánya valószínűleg előmozdítja a tumoros szövetben a sejtek elhalását, ami a PDT hatását tovább fokozza. Modellrendszerünkben ezen jelenségek vezethettek a CPI és a PDT szinergisztikus hatásának kialakulásához.

5.6 Az emelt dózisú PDT és a CPI-vel kombinált PDT hatékonyan csökkenti a tumor térfogatát

Mivel a tumorok méretének változása különböző terápiák alkalmazásakor alapvető prediktív faktor, a kezelések 8-adik napján eltávolított szövetminták térfogatát is mértük. A jelentős tumornekrózist előidéző nagyobb dózisú PS-PDT és CPI kombinációja a tumor térfogatát mindhárom kísérleti protokoll esetén szignifikánsan csökkentette $\sim 2.5 \text{ cm}^3$ -re ($p < 0.001$) a kontroll mintákban mért $4.5\text{-}6 \text{ cm}^3$ térfogatokhoz képest (**25. ábra**). Az alacsonyabb dózisú PS-PDT-CPI terápia szintén szignifikánsan befolyásolta ($p = 0.003$) a tumor méretét, $\sim 3.5 \text{ cm}^3$ -re redukálva azt. A PS-PDT monoterápia enyhébb, de még mindig jelentős hatást fejtett ki a tumor térfogatának csökkentésére, átlagosan $\sim 4.5 \text{ cm}^3$ -t eredményezve ($p = 0.03$ az alacsonyabb és $p = 0.04$ a nagyobb dózisú terápia esetén). A CPI önálló alkalmazása okozta a legkisebb mértékű tumorméret változást ($p = 0.19$). A kombinációs terápia mindkét koncentrációjú fotoszenzitizáló alkalmazása mellett hatékonyabb volt a monoterápiáknál ($0.003 < p < 0.06$ az alacsonyabb és $0.001 < p < 0.003$ a nagyobb dózis esetén), mely hatékonyság közel azonos mértékűnek bizonyult ($p = 0.41$). Nemcsak a nekrosis fokozásánál, hanem a tumorméret-csökkentő hatásnál is szinergisztikusnak mondható mind az alacsonyabb, mind pedig a magasabb dózisú fotoszenzitizálóval kombinált CPI terápia, mivel a monoterápiák összegénél rendre 118, illetve 33%-kal jobb hatás érhető el alkalmazásukkal.

A nekrosisra kifejtett terápiás hatás nagyfokú korrelációt mutatott a csökkent tumor térfogattal (**2. táblázat**). A nagyobb dózisú, azaz a 20 mg/kg PS-PDT-CPI kombináció azonban sokkal hatékonyabb volt a nekrosis mértékének növelésében, mint a tumornövekedés lassításában.



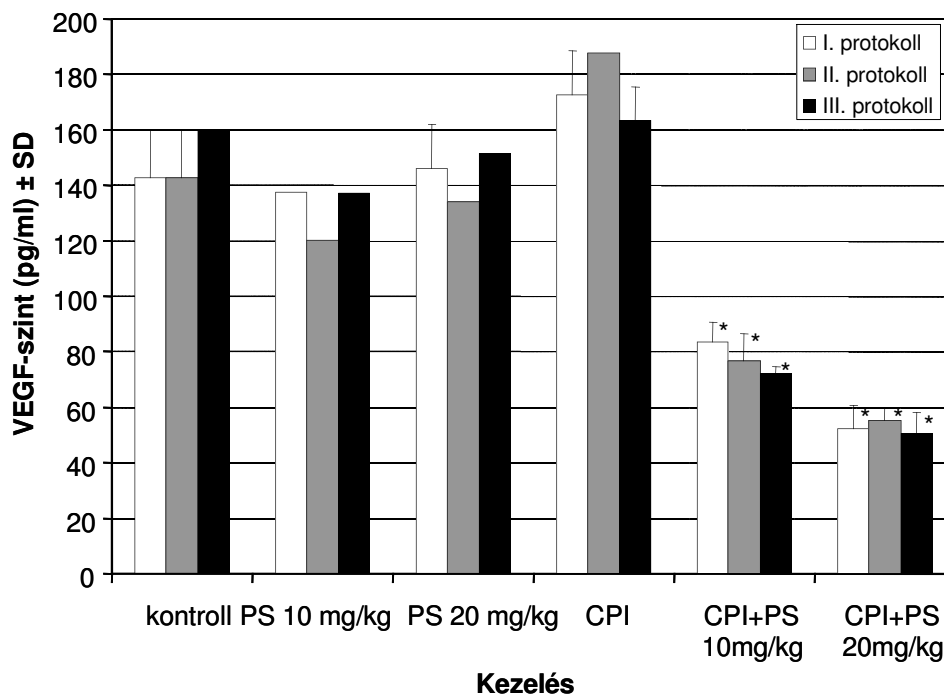
25. ábra A tumorméret változása: A tumor térfogata jelentősen csökken az emelt dózisú PS-PDT hatására mind önállóan, mind CPI-vel történő kombináció esetén. PS: fotoszenzitizer; CPI: cisztatin, *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest ($p < 0.001$).

5.7 A szérumban VEGF szintje a PDT és a CPI kombinációjánál a legalacsonyabb

Előzetes tanulmányok alapján azonban megállapítható (Osiecka és mtsai. 2003), hogy a VEGF szint tumor-hordozó BALB/c egerekben számottevő mértékben csökken a PDT kezelést követő 24, illetve 96 óra múlva. A kapott alacsony szintű VEGF lassabb tumorfejlődéssel, néhány esetben teljes tumor regresszióval, valamint a túlélési idő szignifikáns meghosszabbodásával jár. A VEGF szint csökkentése és receptorának gátlása a tumor angiogenezisének csökkenését, valamint a tumor progressiójának gátlását eredményezi *in vivo*.

Kísérleteinkben az egészséges, tumor nélküli patkányok VEGF szintje alacsonyabb (106.5 ± 7.2 pg/ml) volt, mint a daganatos állatoké, ahol ezen faktor $134-170$ pg/ml koncentrációtartományban ingadozott. PS-PDT monoterápiát követően a szérumban VEGF koncentrációja a kezeletlen kontrollhoz képest enyhén mértékben leesett ($p > 0.15$). A CPI

egyedüli injektálása viszont gyengén megemelte ezen faktor szintjét ($p=0.02$, **26. ábra**), ami valószínűleg a tumor csökkent invázióra és neovaszkularizációra adott feedback válaszának köszönhető. A VEGF mennyisége 20 mg/kg PS-PDT és CPI együttes alkalmazásával volt a legalacsonyabb, de a kisebb fotoszenzitiváló dózisú kombinált terápia is elég hatásosnak bizonyult a kezeletlen kontroll mintákhoz képest ($p<0.001$ mindkét esetben).



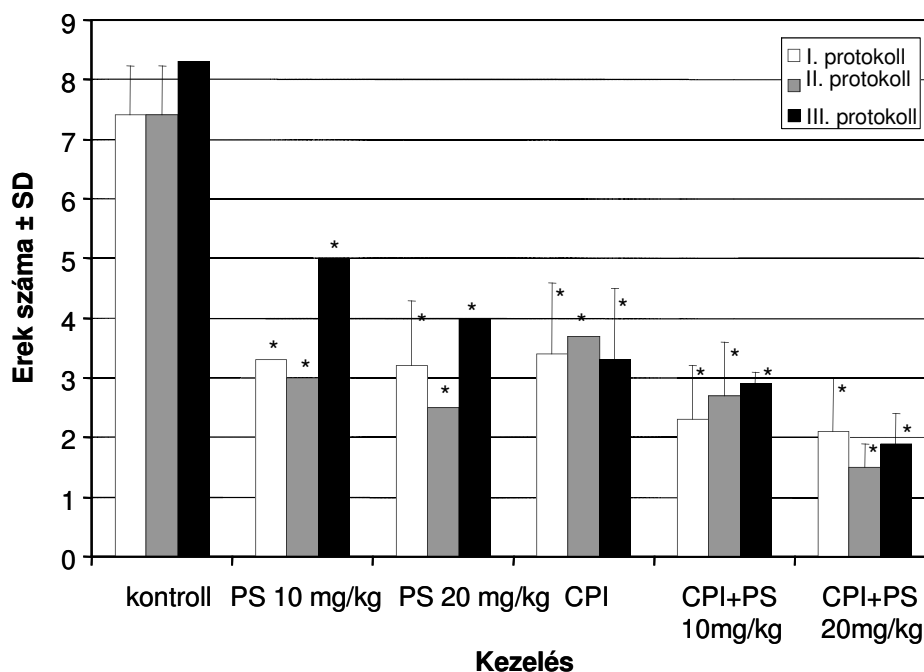
26. ábra VEGF szint a patkányok szérumban: A szérumban VEGF szintje szignifikánsan csökken a kombinált terápia alkalmazását követően. PS: fotoszenzitiváló; CPI: cisztatin, *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest ($p < 0.001$)

Összességében a kombinációs kezelések sokkal hatékonyabbak voltak, mint a monoterápiák ($p<0.001$). A 20 mg/kg PS-PDT-CPI esetén a monoterápiák hatásának összegéből számolt 23%-os nettó emelkedéshez képest 86%-os drasztikus csökkenést értünk el, míg az alacsonyabb dózisú fotoszenzitiválóval kombinált terápiánál a 17%-os nettó növekedéshez képest 56%-os csökkenést tapasztaltunk. A magasabb fotoszenzitiváló dózisú

kombinált terápia jelentősebb VEGF csökkenést okozott, mint a kisebb PS-dózisú kombináció (p=0.001).

5.8 A tumor vaszkularizációjának alakulása a PS-PDT-CPI terápia alkalmazása során

A tumor ereződésének mértékét hematoxilin-eozin festett mintákban határoztuk meg. A vérerek látóterenkénti átlagos száma (**27. ábra**) – ahogyan a redukált VEGF szintnek megfelelően is várható – a kombinált kezelések hatására csökkent le a legnagyobb mértékben (p<0.001 mindkét PS koncentráció esetén). A többi mért paraméterrel ellentétben itt a monoterápiáknak is jelentős redukáló hatásuk volt (p=0.001). Ezzel együtt mindkét koncentrációjú fotoszenzitizerrel kombinált terápia meghaladta a megfelelő PS-dózisú monoterápiák hatását (0.02<p<0.1 az alacsonyabb és 0.001<p<0.02 a magasabb dózis esetén), ugyanakkor egymástól csak kismértékben különböztek (p=0.08).



27. ábra A terápia függvényében ábrázolt tumor vaszkularizáció: A 20 mg/kg PS-PDT-CPI kombinált terápia a leghatásosabb, azonban a vaszkularizáció mértékének csökkentését a monoterápiák is előidézik. PS: fotoszenzitizer; CPI: cisztatin, *: szignifikáns változás a kontrollhoz képest (p < 0.001).

A csökkent tumor neoangiogenezis oka feltehetőleg CPI PS-PDT-vel együtt kifejtett szinergisztikus hatásának köszönhető, mely egyrészt csökkentette a szérumban a VEGF koncentrációját, másrészt gátolta a lokális inváziót, végeredményben a tumor növekedését is gátolva. A **2. táblázat**ban bemutatott korrelációs koefficiensek alátámasztják, hogy a csökkent VEGF szint pozitívan korrelál a csökkent vaszkularizációval. A fentiekkel összhangban mind a VEGF szint, mint vaszkularizáció mértéke pozitív korrelációt mutat a tumor növekedésével, ugyanakkor negatívan korrelál a tumor nekrozisával.

	Tumortérfogat	VEGF szint	Erek száma
Nekrózis mértéke	-0,661	-0,691	-0,625
Tumortérfogat		0,713	0,734
Erek száma			0,568

2. táblázat A vizsgált paraméterek korrelációja: A tumor mérete, a nekrozis mértéke és vaszkularizációja, valamint a szérumban a VEGF szintje közötti korreláció $p < 0.0001$ szignifikancia szinten jelentős. A nekrozis mértéke negatívan korrelál a tumor térfogatával, valamint a VEGF szinttel és az erek számával, míg a tumor térfogata pozitív korrelációt mutat a vér VEGF szintjével és az erek számával. A VEGF szint és a vaszkularizáció között pozitív korreláció áll fenn.

A CPI és a PS-PDT közötti szinergizmus további lehetséges mechanizmusa, hogy a CPI gátlás egyik fő célpontja, a katepszin B, lizoszómális lokalizációjú (Joyce és mtsai. 2004), s mivel a fotoszenzitizálók szintén lizoszómákban akkumulálódnak (Caruso és mtsai. 2004), a besugárzás hatására roncsolódott lizoszómák katepszin B szintje és aktivitása is lecsökken. Mivel a tumorokban megemelkedett katepszin B aktivitás fokozott neoangiogenezissel és tumor invazivitással társul, ennek az aktivitásnak CPI és PS-PDT együttes alkalmazásával történő hatékony gátlása a tumornövekedés megelőzésének fontos faktora lehet.

A PS-PDT monoterápiák alkalmazásakor lecsökkent vaszkularizáció mértéke meghaladja a VEGF szint csökkenésének mértékét. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a

fotodinámiás terápia roncsoló hatása nemcsak a daganatos sejtekben manifesztálódik, hanem az új vérereket képző endotél és mezenhimális sejtekben is (Peng és Nesland 2004). Továbbá az is lehetséges, hogy a PS-PDT a VEGF-on kívül más, az erek kialakulásáért felelős faktorok mennyiségét is megváltoztatja.

A CPI önmagában is jelentősen redukálja a vaszkularizáció mértékét, viszont nem csökkenti a VEGF szintet. Ennek lehetséges oka, hogy a cisztein proteinázok gátlása CPI-vel a VEGF termelődését visszacsatolós szabályozással fokozza, ugyanakkor a CPI a tumorsejtek nekrozisával párhuzamosan a tumor vaszkulaturát is roncsolja. A tumor térfogatok pozitív korrelációja a vér VEGF szintjével alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a szérumban lévő VEGF tartalmának egy része a tumorból ered. A kezelések VEGF szintre és vaszkularizációra kifejtett részben eltérő hatása azonban megmagyarázza, hogy e két paraméter korrelációs koefficiense miért olyan alacsony (**2. táblázat**).

Itt érdemes megjegyezni, hogy a CPI által lecsökkentett neovaszkularizáció önmagában is képes rontani a PDT hatékonyságát, és ezért a CPI tumor sejtekre közvetlenül kifejtett egyéb hatásai fontos szerepet játszhatnak a CPI és PDT szinergizmusában. Például, a CPI TGF β -val együtt kifejtett antagonistikus hatása az emlőkarcinóma sejtek proliferációját mérsékelheti (Sokol és mtsai. 2005).

Eredményeink azt mutatják, hogy a PDT által előidézett sejtkárosodás, valamint a CPI-nek köszönhető tumor invázió gátlás nemcsak közvetlenül, hanem a szérumban csökkenő VEGF koncentrációján keresztül is akadályozhatja a tumor angiogenezisét. Mivel a PDT és a CPI együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyult a tumor nekrozisának, valamint térfogatának és a szérumban lévő VEGF szintjének befolyásolásában – ahol egyébként a monoterápiáknak alig vagy egyáltalán nem volt hatásuk –, a módszer klinikai alkalmazására javasolható különös tekintettel arra, hogy a kezelések során nem lépett fel mellékhatás. A fotodinámiás terápiát már a klinikai gyakorlatban is használják, a CPI alkalmazhatósága

azonban a biztató eredmények ellenére sem teljes mértékben tisztázott. Cegnar és munkatársai cisztatin-kötött nanorészecskék alkalmazásával optimalizálták a célsejtek cisztatin felvételét, minek köszönhetően effektíven lehetett gátolni a katepszin B aktivitását (Cegnar és mtsai. 2004). Paramágneses részecskék ilyen célra történő felhasználása a CPI célzott lokális felhalmozódását is elősegítheti mágneses tér gradiens alkalmazása mellett. Felvetődött annak a lehetősége is, hogy a CPI kifejeződését génterápiával fokozzák; az adenovirus-mediált ektópiás cisztatin C expresszió egerekben megakadályozta a xenograft fibroszarkóma tüdő metasztázisainak képződését (Kopitz és mtsai. 2005). Nem hagyható azonban figyelmen kívül az a tény, miszerint a cisztatinnak és más CPI-nak nemcsak antiproliferatív hanem proliferációt serkentő hatása is lehet, attól függően, hogy milyen rendszert vizsgálunk (Keppler 2005).

6. Összefoglalás

Kísérleteink fő célkitűzése az volt, hogy az emlődaganatok kezelésében már a klinikumban is alkalmazott terápiák hatását egy másik, kipróbálási fázisban lévő ágens bevonásával fokozzuk. Eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

- *In vitro* kísérleteink eredményeiből megállapíthatjuk, hogy a 17-AAG az ErbB2 homodimerizációt és foszforilációt fokozza mind trastuzumab szenzitív, mind rezisztens emlőtumor sejteken, és hosszútávon a receptor leszabályozását és a sejtproliferáció gátlását idézi elő, melynek háttérében elsősorban apoptózis, nagyobb dózisoknál részben nekrozis áll. Ennek alapján a 17-AAG alkalmas lehet a trastuzumab-rezisztens, ErbB2-pozitív tumorok kezelésére.
- Az ErbB2-t nagymértékben expresszáló trastuzumab szenzitív daganatsejtek esetén a 17-AAG proliferációt gátló hatása a nagyszámú ErbB2 receptor aktivációja miatt alacsonyabb. Ilyen tumoroknál a trastuzumabbal történő kombináció hatásos lehet a 17-AAG által kiváltott ErbB2 foszforiláció gátlásában, valamint az alacsony dózisú 17-AAG növekedést gátló hatásának fokozásában.
- *In vivo* tanulmányainkban a cisztein proteináz inhibitor (CPI) fotodinamias terápiahoz (PDT) társítva szinergisztikusan gátolja a patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma növekedését, fokozza a tumornekrozist, s ennek háttérében legalábbis részben a szinergista módon csökkentett szérum VEGF szint, ill. a következményes nagyfokú neovaszkularizáció-gátlás áll.
- A PDT és CPI kombinációja a Wistar patkányokba implantált szolid emlőkarcinóma progresszióját 20 mg/kg HpD, 500 µg/állat CPI és 90 J/cm² fotondózisú besugárzás mellett képes leghatékonyabban gátolni. A legjobb eredményeket az inokulációval egyidőben elkezdett terápia adja, ami arra utal, hogy a kombinációs kezelés különösen hatékony lehet a szóródott, ill. reziduális daganatsejtek elpusztításában.

7. Gyakorlati jelentőség

In vitro eredményeink gyakorlati jelentősége kettős: egyrészt igazolja a 17-AAG monoterápia hatékonyságát trastuzumab-rezisztens, de ErbB2-pozitív emlőtumорок esetén, másrészt felhívja a figyelmet arra, hogy magas ErbB2 szintű emlőtumорок 17-AAG terápiáját érdemes lehet az adverz hatásként jelentkező ErbB2 foszforiláció csökkentése érdekében trastuzumabbal kombinálni. Ennek a megfigyelésnek külön apropót ad, hogy a jelenlegi egyetlen klinikai kipróbálásból, ahol 17-AAG-t alkalmaznak, a korábbi vagy fennálló trastuzumab kezelés kizáró ok. Olyan 17-AAG-trastuzumab konjugátum létrehozásával azonban már kísérleteztek, amit az ErbB2-t túlzott mértékben kifejező tumorokhoz adva egyfajta specifikus chaperon terápiát teremtene. Egy ilyen konjugátum alkalmazása azonban megköveteli annak pontos ismeretét, hogy milyen hatása van a 17-AAG és a trastuzumab együttes adásának a különböző expressziós szintű és eltérő trastuzumab-rezisztencia fokú tumorokban.

In vivo eredményeink azt mutatják, hogy a PDT által előidézett sejtkárosodás valamint a CPI-nek köszönhető tumor invázió gátlás nemcsak közvetlenül, hanem a szérumban csökkenő VEGF koncentrációján keresztül is akadályozhatja a tumor neoangiogenezisét. Mivel a PDT és a CPI együttes alkalmazása szinergisztikusnak bizonyult a tumor nekrózisának valamint térfogatának és a szérumban VEGF szintjének befolyásolásában, és mellékhatásokat sem tapasztaltunk, a módszer további preklinikai tesztelése javasolható.

8. Referenciák

1. Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, McCarty MF, Takeda A, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Jung YD, Bucana CD and others. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer* 88(5):796-802. 2003.
2. Alvarez-Fernandez M, Liang YH, Abrahamson M, Su XD. Crystal structure of human cystatin D, a cysteine peptidase inhibitor with restricted inhibition profile. *J Biol Chem* 280(18):18221-8. 2005.
3. Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, Klumperman J, Scheller RH. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15(12):5268-82. 2004.
4. Bagatell R, Khan O, Paine-Murrieta G, Taylor CW, Akinaga S, Whitesell L. Destabilization of steroid receptors by heat shock protein 90-binding drugs: a ligand-independent approach to hormonal therapy of breast cancer. *Clin Cancer Res* 7(7):2076-84. 2001.
5. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J and others. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14(3):737-44. 1996.
6. Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N. Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21(8):1159-66. 2002.
7. Betz CS, Stepp H, Janda P, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R, Leunig A. A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis. *Int J Cancer* 97(2):245-52. 2002.
8. Bolin FP, Preuss LE, Cain BW. A comparison of spectral transmittance for several mammalian tissues: effects at PRT frequencies. *Prog Clin Biol Res* 170:211-25. 1984.
9. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Ryden S, Sigurdsson H. ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett* 81(2):137-44. 1994.
10. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1):273-8. 1992.
11. Campone M, Merlin JL, Fumoleau P. [Role of the combination of trastuzumab and taxanes in the therapeutic management of cancer of the breast: from preclinical data to clinical application]. *Bull Cancer* 90(7):614-22. 2003.
12. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR and others. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 14(10):2702-8. 1996.
13. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H and others. Synergism between vascular endothelial growth factor and

- placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7(5):575-83. 2001.
14. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4285-9. 1992.
 15. Caruso JA, Mathieu PA, Joiakim A, Leeson B, Kessel D, Sloane BF, Reiners JJ, Jr. Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents. *Mol Pharmacol* 65(4):1016-28. 2004.
 16. Cegnar M, Premzl A, Zavasnik-Bergant V, Kristl J, Kos J. Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. *Exp Cell Res* 301(2):223-31. 2004.
 17. Cheng T, Hitomi K, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Yamamoto K, Nishi K, Watts C, Reinheckel T, Schalkwijk J, Zeeuwen PL. Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem* 281(23):15893-9. 2006.
 18. Chiosis G, Huezio H, Rosen N, Mimnaugh E, Whitesell L, Neckers L. 17AAG: low target binding affinity and potent cell activity--finding an explanation. *Mol Cancer Ther* 2(2):123-9. 2003.
 19. Chiosis G, Timaul MN, Lucas B, Munster PN, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, Rosen N. A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. *Chem Biol* 8(3):289-99. 2001.
 20. Citri A, Gan J, Mosesson Y, Vereb G, Szollosi J, Yarden Y. Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation. *EMBO Rep* 5(12):1165-70. 2004.
 21. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6(4):443-6. 2000.
 22. Csermely P. Chaperone overload is a possible contributor to 'civilization diseases'. *Trends Genet* 17(12):701-4. 2001.
 23. Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res* 292(1):187-200. 2004.
 24. Degtarev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 22(53):8543-67. 2003.
 25. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20(21):4368-80. 2002.
 26. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL, Mass RD, Sanders C, Press MF. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 93(1):3-11. 2005.

27. Ellis LM, Staley CA, Liu W, Fleming RY, Parikh NU, Bucana CD, Gallick GE. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem* 273(2):1052-7. 1998.
28. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, Cristofanilli M, Arun B, Esmaeli B, Fritsche HA and others. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20(7):1800-8. 2002.
29. Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 140(3):539-44. 1992.
30. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6):669-76. 2003.
31. Ferrario A, Rucker N, Ryter SW, Doiron DR, Gomer CJ. Direct comparison of in-vitro and in-vivo Photofrin-II mediated photosensitization using a pulsed KTP pumped dye laser and a continuous wave argon ion pumped dye laser. *Lasers Surg Med* 11(5):404-10. 1991.
32. Foekens JA, Kos J, Peters HA, Krasovec M, Look MP, Cimerman N, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol* 16(3):1013-21. 1998.
33. Friedlander E, Arndt-Jovin DJ, Nagy P, Jovin TM, Szollosi J, Vereb G. Signal transduction of erbB receptors in trastuzumab (Herceptin) sensitive and resistant cell lines: local stimulation using magnetic microspheres as assessed by quantitative digital microscopy. *Cytometry A* 67(2):161-71. 2005.
34. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270(5241):1500-2. 1995.
35. Fry DW, Bridges AJ, Denny WA, Doherty A, Greis KD, Hicks JL, Hook KE, Keller PR, Leopold WR, Loo JA and others. Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20):12022-7. 1998.
36. Gal D. Hunt for singlet oxygen under in vivo conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 202(1):10-6. 1994.
37. Giani C, Casalini P, Pupa SM, De Vecchi R, Ardini E, Colnaghi MI, Giordano A, Menard S. Increased expression of c-erbB-2 in hormone-dependent breast cancer cells inhibits cell growth and induces differentiation. *Oncogene* 17(4):425-32. 1998.
38. Halverson KJ, Taylor ME, Perez CA, Garcia DM, Myerson R, Philpott G, Levy J, Simpson JR, Tucker G, Rush C. Regional nodal management and patterns of failure following conservative surgery and radiation therapy for stage I and II breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26(4):593-9. 1993.
39. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19(53):6102-14. 2000.
40. Hood JL, Brooks WH, Roszman TL. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* 279(41):43126-35. 2004.

41. Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene* 21(49):7524-32. 2002.
42. Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, Greenbaum DC, Hager JH, Bogyo M, Hanahan D. Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 5(5):443-53. 2004.
43. Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett.* 2005.
44. Klapper LN, Waterman H, Sela M, Yarden Y. Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res* 60(13):3384-8. 2000.
45. Kokai Y, Myers JN, Wada T, Brown VI, LeVeae CM, Davis JG, Dobashi K, Greene MI. Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 58(2):287-92. 1989.
46. Kono K, Sato E, Naganuma H, Takahashi A, Mimura K, Nukui H, Fujii H. Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10(7):2538-44. 2004.
47. Kopitz C, Anton M, Gansbacher B, Kruger A. Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res* 65(19):8608-12. 2005.
48. Kostenich GA, Zhuravkin IN, Furmanchuk AV, Zhavrid EA. Photodynamic therapy with chlorin e6. A morphologic study of tumor damage efficiency in experiment. *J Photochem Photobiol B* 11(3-4):307-18. 1991.
49. Lah TT, Kos J. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 379(2):125-30. 1998.
50. Lah TT, Kos J, Blejec A, Frkovic-Georgio S, Golouh R, Vrhovec II, Turk VV. The Expression of Lysosomal Proteinases and Their Inhibitors in Breast Cancer: Possible Relationship to Prognosis of the Disease. *Pathol Oncol Res* 3(2):89-99. 1997.
51. Lane H, Neve, J., Daly, J. D. et al. Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio. 1998.
52. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329(6140):630-2. 1987.
53. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J* 17(12):3385-97. 1998.
54. Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267(5205):1782-8. 1995.
55. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 12(23):3663-74. 1998.

56. Liu C, Sun C, Huang H, Janda K, Edgington T. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy. *Cancer Res* 63(11):2957-64. 2003.
57. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93(24):1852-7. 2001.
58. McCaughan JS, Jr., Williams TE. Photodynamic therapy for endobronchial malignant disease: a prospective fourteen-year study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 114(6):940-6; discussion 946-7. 1997.
59. Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer* 56(6):777-82. 1994.
60. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62(11):3151-8. 2002.
61. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT and others. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6(2):117-27. 2004.
62. Nagy P, Bene L, Balazs M, Hyun WC, Lockett SJ, Chiang NY, Waldman F, Feuerstein BG, Damjanovich S, Szollosi J. EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry* 32(2):120-31. 1998.
63. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65(2):473-82. 2005.
64. Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szollosi J, Damjanovich S, Jovin TM. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci* 112 (Pt 11):1733-41. 1999.
65. Naunheim KS, Petruska P, Roy TS, Andrus CH, Johnson FE, Schlueter JM, Baue AE. Preoperative chemotherapy and radiotherapy for esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103(5):887-93; discussion 893-5. 1992.
66. Niestroj AJ, Feussner K, Heiser U, Dando PM, Barrett A, Gerhartz B, Demuth HU. Inhibition of mammalian legumain by Michael acceptors and AzaAsn-halomethylketones. *Biol Chem* 383(7-8):1205-14. 2002.
67. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 363(9412):837-40. 2004.
68. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Jama* 286(12):1490-3. 2001.
69. Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18(9):5042-51. 1998.

70. Osiecka BJ, Ziolkowski P, Gamian E, Lis-Nawara A, White SG, Bonnett R. Determination of vascular-endothelial growth factor levels in serum from tumor-bearing BALB/c mice treated with photodynamic therapy. *Med Sci Monit* 9(4):BR110-4. 2003.
71. Peng Q, Nesland JM. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct Pathol* 28(5-6):333-40. 2004.
72. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10(12):2435-46. 1995.
73. Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L, Carraway KL. Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 99(6):783-91. 2002.
74. Qian P, Evensen JF, Rimington C, Moan J. A comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake C3H-tumors and tissues of mice. *Cancer Lett* 36(1):1-10. 1987.
75. Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 9(9):934-44. 2002.
76. Riese DJ, 2nd, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15(10):5770-6. 1995.
77. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16(6):413-28. 1998.
78. Saleh Y, Siewinski M, Kielan W, Ziolkowski P, Grybos M, Rybka J. Regulation of cathepsin B and L expression in vitro in gastric cancer tissues by egg cystatin. *J Exp Ther Oncol* 3(6):319-24. 2003.
79. Saleh Y, Ziolkowski P, Siewinski M, Milach J, Marszalik P, Rybka J. The combined treatment of transplantable solid mammary carcinoma in Wistar rats by use of photodynamic therapy and cysteine proteinase inhibitor. *In Vivo* 15(4):351-7. 2001.
80. Sausville EA. Combining cytotoxics and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin: sequence and tumor biology matters. Commentary re: P. Munster et al., Modulation of Hsp90 function by ansamycins sensitizes breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis in an RB- and schedule-dependent manner. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2228-2236, 2001. *Clin Cancer Res* 7(8):2155-8. 2001.
81. Shapiro CL, Manola J, Leboff M. Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 19(14):3306-11. 2001.
82. Shirahama-Noda K, Yamamoto A, Sugihara K, Hashimoto N, Asano M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *J Biol Chem* 278(35):33194-9. 2003.
83. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177-82. 1987.

84. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M and others. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92. 2001.
85. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26(4 Suppl 12):60-70. 1999.
86. Sokol JP, Neil JR, Schiemann BJ, Schiemann WP. The use of cystatin C to inhibit epithelial-mesenchymal transition and morphological transformation stimulated by transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res* 7(5):R844-53. 2005.
87. Soltoff SP, Cantley LC. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem* 271(1):563-7. 1996.
88. Strizhak P, Kriska,T., Gal, D.,. Mechanism of *in vivo* photodynamic effects. *Proc SPIE* 2625:356-368. 1996.
89. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 3(12):1585-92. 2004.
90. Toth J, Szentkuti A. [Expression of HER2 in breast cancer]. *Magy Onkol* 44(1):39-51. 2000.
91. Tran D, Sinclair RD, Schwarer AP, Chow CW. Permanent alopecia following chemotherapy and bone marrow transplantation. *Australas J Dermatol* 41(2):106-8. 2000.
92. Tripathy B. *Ovarian Cancer Research Notebook*. 1998.
93. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16(10):5276-87. 1996.
94. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2):203-12. 1990.
95. van Leeuwen JE, Paik PK, Samelson LE. Activation of nuclear factor of activated T cells-(NFAT) and activating protein 1 (AP-1) by oncogenic 70Z Cbl requires an intact phosphotyrosine binding domain but not Crk(L) or p85 phosphatidylinositol 3-kinase association. *J Biol Chem* 274(8):5153-62. 1999a.
96. van Leeuwen JE, Paik PK, Samelson LE. The oncogenic 70Z Cbl mutation blocks the phosphotyrosine binding domain-dependent negative regulation of ZAP-70 by c-Cbl in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 19(10):6652-64. 1999b.
97. Vereb G, Matko J, Szollosi J. Cytometry of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Cell Biol* 75:105-52. 2004.
98. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31(6):637-43. 1999.
99. Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Oncol* 3(1):37-45. 2005.
100. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S3-8. 2001.

101. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-37. 2001.
102. Ziolkowski P, Milach J, Symonowicz K, Chmielewski P, Latos-Grazynski L, Marcinkowska E. 5,20-bis(4-sulphophenyl)-10,15-bis (2-methoxy-4-sulphophenyl)-21-thiaporphyrin as a new potent sensitizer in photodynamic therapy. *Tumori* 81(5):364-9. 1995.

9. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Zsebik B., Citri A., Isola J., Yarden Y., Szöllősi J., Vereb Gy.:

Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1

Immunology Letters (2006) 104(1-2):146-55

IF: 2,301 (2005)

Zsebik B., Symonowicz K., Saleh Y., Ziolkowski P., Bronowicz A., Vereb Gy.:

Photodynamic therapy combined with a cysteine protease inhibitor synergistically decrease VEGF production and promote tumour necrosis in a rat mammary carcinoma

Cell Proliferation (2006) in press

IF: 4,462 (2005)

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és előadások:

Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György (poszter)

ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben

XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. május 20-23.

Zsebik Barbara, Fazekas Zsolt, Petrás Miklós, Szöllősi János, Vereb György (poszter)

Az ErbB2 receptorok molekuláris kölcsönhatásai és foszforilációja Herceptin szenzitív és rezisztens emlőtumor sejtekben eltérők

A Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003. augusztus 24-27.

Barbara Zsebik, Miklós Petrás, János Szöllősi, György Vereb (poster)

Possible use of Hsp inhibitor 17-AAG for treating Herceptin resistant breast tumors

International School of Biophysics, Timisu de Sus-Predeal, Romania, 7-12 October, 2003

Zsebik Barbara, Horváth Gábor, Petrás Miklós, Szöllősi János és Vereb György (poszter)

Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei Herceptin és 17-AAG kombinációjával

IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2004. május 6-8.

Barbara Zsebik, Miklós Petrás, Jorma Isola, János Szöllősi, György Vereb (outstanding poster award)

ErbB2 homodimerization and activation in Herceptin resistant and sensitive cell lines

International Biophysics Congress, Montpellier, France, 22-27 May, 2004

Zsebik Barbara, Horváth Gábor, Petrás Miklós, Szöllősi János és Vereb György (poszter)

Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei Herceptin és 17-AAG kombinációjával

XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2004. június 1-4.

Barbara **Zsebik**, Krzysztof Symonowicz, Yousif Saleh, Piotr Ziolkowski, Andrzej Bronowicz, György Vereb (poszter)

Photodynamic therapy combined with a cystein protease inhibitor synergistically decreases VEGF production and promotes tumour necrosis in a rat mammary carcinoma

14th Annual Conference of the German Society for Cytometry, Leipzig, October 19-22, 2005

Zsebik Barbara (előadás)

ErbB2 receptorok homoasszociációja és tirozin foszforilációja humán emlőtumor sejtekben

DE OEC Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 2003. február 24-28.

Zsebik Barbara (előadás)

Herceptin rezisztens emlőtumorok adjuváns terápiájának lehetőségei

DE OEC Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen, 2004. április 5-9.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó poszter:

Ujlaky-Nagy László, Petrás Miklós, **Zsebik** Barbara, Szöllösi János, Vereb György (poszter)

A PDGF-receptor- β működése A172 glioblastóma sejteken a lipid tutajokhoz kötött

III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2002. május 16-18.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vereb Györgynek, hogy az elmúlt évek során – időt és fáradságot nem kímélve – egyengette pályafutásomat, megismertetett a kutatómunka szépségével, izgalmával, és hogy mindvégig támogatta fejlődésemet, előrehaladásomat.

Külön köszönet illeti Dr. Szöllősi János egyetemi tanárt, aki támogatásával, tapasztalataival szintén jelentősen hozzájárult eredményeim eléréséhez. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Petrás Miklósnak a közös kísérletezéseink alkalmával tanúsított segítőkészségéért. Köszönöm munkatársaim, Dr. Horváth Gábor, Dr. Ujlaky-Nagy László, Dr. Barok Márk és Dr. Orosz Ágnes munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Köszönöm Dr. Szöllősi Zoltánnak a patkány adenokarcinoma minták immunhisztokémiai vizsgálatát.

Köszönettel tartozom Anna Trzeciak és Józef J. Ziolkowski külföldi koordinátoraimnak, akik lehetővé tették, hogy a lengyelországi Wrocław-i Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetében egy félévet eltöltssek. Kitüntető köszönet illeti külföldi témavezetőmet, Piotr Ziolkowskit és munkatársamat, Krzysztof Symonowiczot, akik barátságos légkörben szakmai és gyakorlati tanácsaikkal támogatták munkámat.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni Őri Gabriellának, Pálné Terdik Tündének és Harangi Istvánnénak a munkám gyakorlati része során nyújtott rengeteg segítséget.