

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) szerepe a trastuzumab hatásmechanizmusában

Barok Márk



**Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
Debrecen, 2007.**

BEVEZETÉS

A mellrák az egyik leggyakrabban előforduló daganatos megbetegedés. Annak ellenére, hogy az utóbbi 30 évben jelentős előrelépések történtek a szűrésében és a kezelésében, ez a betegség évente fél millió ember haláláért felelős világszerte. A mellrákkal diagnosztizált betegek körülbelül felénél áttétes betegség fejlődik ki. Az áttétes mellrák kezelése palliatív, a betegség kiújulása esetén az átlagosan várható élettartam 24 és 30 hónap között van.

Dennis Slamon és mksai 1987-es és 1989-es tanulmányaikban megmutatták, hogy a mellrákok mintegy 30%-ában a ráksejtek fokozottan fejeznek ki egy ErbB2 nevű fehérjét. A tanulmányok összefüggést találtak a gén amplifikációja ill. a fehérje fokozott kifejeződése és a mellrákos betegek túlélése között.

Ez a két tanulmány egy új terápiás módszert alapozott meg, amelynek támadáspontja az ErbB2.

Az ErbB2 szerepe mellrákokban

Bár az az epidermális növekedési faktor receptor családba tartozó ErbB2 amplifikációját számos daganatban kimutatták, úgy tűnik, hogy legfontosabb szerepe a mellrákok növekedésének szabályozásában van. Míg az emlő nem malignus epitelsejtein 20 000 – 50 000 darab ErbB2 receptor van, a mellráksejteken akár 2 millió is lehet. Ennek az esetek túlnyomó részében az ErbB2 gén amplifikációja az oka. Az ErbB2 fokozott expressziója összefügg a daganat magas szövettani grádussal, a ráksejtek magas mitotikus aktivitásával, a p53 gén mutációjával, a daganat negatív ösztrogén receptor státusával. Ha a beteg daganata ErbB2 pozitív, betegségének rosszabb a prognózisa, mint az ErbB2 negatív betegeké: valószínűbbek az áttétek és rövidebb a relapszusmentes túlélés.

Az ErbB2-nek központi szerepe van az ErbB receptor család általi jelátvitelben, így a funkciójának blokkolása jelentősen csökkentheti a daganatsejtek növekedését.

Az ErbB2 ellenes antitestterápia, a trastuzumab

A United States Food and Drug Administration (FDA) által 1998-ban engedélyezett trastuzumabot (kereskedelmi nevén: Herceptin[®]) ma a következő kritériumokat teljesítő esetekben használják:

- monoterápia formájában, olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg már legalább 2 kemoterápiás szerrel kezeltek.

- kombinálva paclitaxellel olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg még nem kezeltek kemoterápiás szerrel.
- 2006 novemberében, miután széleskörű klinikai vizsgálatorozatban a hagyományos kemoterápia kiegészítése trastuzumabbal a betegség kiújulásának kockázatát felére, a megfigyelési időszakon belüli halálozás kockázatát pedig harmadára csökkentette, az FDA engedélyezte a trastuzumab-kezelést a korai emlőrák adjuváns kezelése is.

Hogyan hat a trastuzumab?

A trastuzumab hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott, bár rengeteg *in vitro* és *in vivo* kísérletet terveztek a megértésére. Az antitest Fab és Fc részének is fontos szerepe van a daganatgátló hatásban. Az Fab részen keresztül kifejtett hatásoknak azt nevezem, amiket a trastuzumab az ErbB2-höz való kapcsolódásával magukon a daganatsejteken előidéz. Az Fc részen keresztüli hatáson azt értem, hogy az ErbB2-höz kötött trastuzumab Fc részét Fc-receptorral rendelkező immunsejtek felismerik, majd antitest-közvetítette sejtöléssel (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = ADCC) megölik a daganatsejtet; a komplement-közvetítette sejtölés (complement-dependent cytotoxicity = CDC) is az Fc részen keresztül valósul meg. *In vitro* kísérletekben az Fab részen keresztüli hatásokat vizsgálhatjuk, *in vivo* mindkét részen keresztüli hatás megvan.

In vitro kísérletekben bizonyították, hogy a trastuzumab: bivalens antitestként keresztüköt két ErbB2 receptort, olyan jelátviteli utakat indítva ezzel el, amelyek egyik végeredménye az ErbB2 internalizációja és degradációja: a sejtfelszíni ErbB2 mennyiség csökkenése; gátolja a mitogén aktiválta protein kináz és a foszfatidil-inozitol-3 kináz szignalizációs útvonalakat; csökkenti ciklin D1 expresszióját, ezáltal csökken a ciklin-dependens kináz inhibitor p27^{kip1} szint: a sejtciklus leáll a G1 fázisban; apoptózist vált ki; növeli az ErbB2 HLA-I-hez kapcsolódó antigénprezentációjának mértékét.

In vivo trastuzumab-kezelés emlőrák-xenograftokban csökkentette a kis erek számát és átmérőjét, aminek háttérében 4 érképződést segítő növekedési faktor expressziójának csökkenését (VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), angiopoietin-1, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)), és az érképződést gátló TSP-1 (thrombospondin-1) szintjének növekedését találták.

Természetesen a trastuzumab Fab része elengedhetetlen ahhoz, hogy az antitest az ErbB2-höz kapcsolódjon. De vajon mekkora rész jut a trastuzumab daganatgátló hatásából az Fab és mekkora az Fc részén keresztül kifejtett hatásnak? A kérdés eldöntésére Clynes és munkacsoportja két kulcsfontosságú kísérletet végzett. BT474, *in vitro* trastuzumabra

érzékeny mellráksejteket oltottak ép Fc γ R-ral és Fc γ R-defektussal rendelkező immunhiányos egerekbe. Az egereket hetente kezelték trastuzumabbal. Az ép Fc γ R-ral rendelkező egerekben a trastuzumab meggátolta a daganatnövekedést, az Fc γ R-defektussal rendelkező egerekben viszont a növekedésgátló hatásának mintegy 2/3-át elveszítette. Ezután a 4D5 antitestből Fc részének egyetlen aminosavának cseréjével egy Fc γ R-hoz kötődni képtelen antitestet hoztak létre, amely megőrizte *in vitro* daganatgátló képességét, de *in vivo* hatásának jó részét elveszítette.

Úgy tűnik tehát, hogy a trastuzumab daganatgátló hatásának mintegy 2/3-részéért az ADCC a felelős, 1/3-részéért pedig az antitestnek közvetlenül a daganatsejteken kifejtett hatása.

A trastuzumab-rezisztencia

A meggyőző klinikai eredmények ellenére, sajnos jónéhány ErbB2 pozitív mellrák elsődlegesen rezisztens (primer rezisztencia) a trastuzumab-terápiára, az esetek nagy részében pedig körülbelül 1 éves trastuzumab-kezelés után ellenállóvá válnak a daganatok a kezelésre (szerzett rezisztencia). Az alábbi mechanizmusok egyaránt felelősek lehetnek a primer és a szerzett trastuzumab-rezisztenciáért:

1. Különböző alternatív túlélési útvonalak aktiválódása:
 - EGF-szerű ligandumok autokrin termelése fokozhatja az ErbB család más tagjain keresztüli jelátvitelt.
 - Az inzulin-szerű növekedési faktor receptor útvonalának aktiválódása.
 - Akt útvonal aktiválódása.
 - A MUC4 nevű sejtfelszíni szialomucin, vagy a hialuronsav eltakarhatja az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját a trastuzumab elől.
2. A PTEN tumorszuppresszor csökkent expressziója.
3. Hiba az ADCC-ben: lásd alább.

Jóllehet Clynes és munkacsoportja fent részletezett kísérlete világossá tette, hogy a trastuzumab hatásának nagyobb részéért az ADCC felel, mégis csak kevés közlemény foglalkozik azzal, hogy mi lehet a szerepe/jelentősége az ADCC-nek a trastuzumab-rezisztenciában. Mimura és mksai kísérletükben azt a nyelőcsőrák sejtvonalat, amely *in vitro* TGF- β -t (transforming growth factor- β) termelt, ErbB2 pozitivitása ellenére jóval kisebb mértékben tudták az NK sejtek trastuzumab-közvetítette sejtöléssel megölni, mint az ErbB2-t hasonló mértékben kifejező, de TGF- β -t nem termelő sejteket. Ha az

ellenálló sejteket TGF- β -t semlegesítő antitesttel kezelték, érzékennyé váltak a trastuzumab-közvetítette sejtölésre. Kono és mksai előrehaladott gyomorrákos betegekből izolált NK sejtek (NK_{beteg}) trastuzumab-közvetítette sejtölő képességét vizsgálták *in vitro*. A kontroll NK sejtekhez (NK_{kontroll}) képest az NK_{beteg} sejtek sokkal kisebb mértékű ADCC-t váltottak ki. Ezzel párhuzamosan megfigyelték, hogy az NK_{beteg} sejteken alacsonyabb az ADCC-ben kulcsfontosságú CD16 ζ alegységének expressziós szintje. *In vitro* interleukin-2 kezeléssel növelni tudták az NK_{beteg} sejtek CD16 ζ expresszióját, a megnövelt CD16 ζ expressziójú sejtek pedig az NK_{kontroll} sejtekhez hasonló mértékű trastuzumab-közvetítette sejtölésre voltak képesek.

A JIMT-1 sejtvonal

Az irodalomban és a sejtbankokban megtalálható ErbB2 pozitív mellrák sejtvonalak mindegyike érzékeny a trastuzumabra *in vitro*. Ugyan az ezekből a sejtvonalakból *in vitro* előállított trastuzumab-rezisztens al-sejtvonalak vizsgálatával is jelentős eredményeket kaphatunk, mégis nagyon fontosnak tartom, hogy 2004-ben egy trastuzumab kezelésre klinikailag rezisztens, 62 éves, ErbB2 pozitív mellrákos nőbeteg mellüregi, daganatos folyadékgyüleméből izolálta Jorma Isola és Minna Tanner a JIMT-1 sejtvonalat. Annak ellenére, hogy a JIMT-1 sejtekben az ErbB2 gén amplifikálódott és a sejteken mintegy 300 000 darab ErbB2 receptor van, a JIMT-1 sejtek *in vitro* és *in vivo* állatkísérletben egyaránt trastuzumab-rezisztensnek bizonyultak.

Az áttétképződésről, röviden

A legtöbb daganatos beteg halálát a primer daganatból leváló daganatsejtekből távoli szervekben képződött áttétek okozzák. Az áttétképződésben központi szerepük van a vérben keringő daganatos sejteknek, a disszeminálódott daganatsejteknek és a többsejtes daganatsejt-aggregátumoknak, mert minden áttét ezekből fejlődik ki; jóllehet egy igen kevésbé hatékony folyamatban. 1 grammnyi primer daganatszövetből naponta körülbelül 10^6 darab daganatsejt válik le és kerül a vér/nyirokkeringésbe. Az intravazáció általában a daganat mozaikos falú erein keresztül történik, amelyeknek a falát endotél és tumor sejtek együtt alkotják. Chang és mksai számításai szerint naponta az ér lumenével érintkező daganatsejtek mintegy fele szakad le és válik *vérben keringő daganatos sejté* (VKDS). Habár rendkívül nagy mennyiségű daganatsejt jut a keringésbe, csak elenyésző hányadukból lesz áttét: Luzzi és mksai számításai szerint a VKDS-ek csak mintegy 0.02%-ából lesz metasztázis. A legtöbb VKDS elpusztul a keringésben az immunrendszer támadása, a hemodinamikai erők, vagy a

sejt-sejt és a sejt-mátrix kapcsolatok elvesztésének következtében kiváltott apoptózis által. Néhány VKDS kilép a keringésből és távoli szövetekben *disszeminált daganatsejtként (DDS)* akár évekig is meghúzódhat. A VKDS-ek és a DDS-ek a sejtciklus G₀ fázisában lévő, nem osztódó sejtek, ezért a legtöbb kemoterápiás szer nem hat rájuk. A keringésből kilépett VKDS-ek mintegy 2%-a kezd osztódni és képez *mikrometasztázist*. Még kisebb hányadukból (0.02%) lesz valódi *metasztázis*. Habár nagyon kevés keringő és a disszeminált daganatsejt fejlődik metasztázissá, mivel a mellrákok átlagos átmérője a diagnózis pillanatában 2-3 cm, a diagnózisig ill. a terápia megkezdéséig óriási számú tumorsejt juthat a keringésbe. Az áttétes emlőrákos betegek 60%-ában találtak legalább 2 VKDS-et, 49% vérében 5-nél több és 21% vérében 50-nél is több volt (7,5 ml vérmintában vizsgálva). Azoknak az I-III stádiumú mellrákbetegeknek, akiknek a csontvelőjében mikrometasztázisokat találtak (30%), magasabb grádusú primer daganatuk és több nyirokcsomó-áttétjük volt. A VKDS-ek, a DDS-ek és a mikrometasztázisok jelenléte mind primer, mind áttétes mellrákos betegeknél összefügg a betegség rossz prognózisával. A primer daganatból nem csak egysejtes formában szakadnak le sejtek: *keringő, többsejtes daganatsejt-aggregátumoknak (KTDA)* nevezzük a primer daganatból együtt, egymással kapcsolódva leszakadt daganatsejt-kupacot, amelyben a sejtek együtt érik el a keringést és együtt vándorolnak. Az együttes vándorlásnak számos előnye van: a sejtakupac által termelt növekedést/migrációt segítő faktorok magas lokális koncentrációja autoktin/parakrin úton hat a sejtekre; a kupac középpontjában lévő sejtek védettebbek az immunrendszer támadásai és a érrendszerben fellépő nyíróerőkkel szemben; a KTDA-ok a kapillárisokban fennakadnak, sejtjeik osztódni kezdenek, a kapilláris elpattan és a daganatsejt-kupac metasztázissá fejlődik. A KTDA-ok jelenléte a vérben azt jelzi, hogy nagy az áttétképződés veszélye.

A trastuzumab-kezelés hatása a vérben keringő daganatos sejtekre (VKDS) és a mikrometasztázisokra

I-III stádiumú mellrákos betegeknél az ErbB2 pozitív VKDS-ek jelenléte együtt járt a primer daganat nagyobb méretével, negatív ösztrogén receptor státuszával, alacsony szövettani differenciáltságával, a nyirokérrendszer daganatos inváziójával, a betegség kedvezőtlen klinikai kimenetelével. Bozionellou és mksai megmutatták, hogy a trastuzumab képes csökkenteni a VKDS-ek és a csontvelői mikrometasztázisok számát kemoterápiára rezisztens mellrákos betegeknél.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során elsődleges célunk az volt, hogy vizsgáljuk és próbájuk megérteni a trastuzumab-rezisztencia mechanizmusát JIMT-1 – SCID egér modell-rendszerünkben. Ezt az alábbi kérdésekkel kívántuk megközelíteni:

- A Tanner és mksai által leírt JIMT-1 sejtekből nude egerekben kifejlődött daganatok nem válaszoltak trastuzumab kezelésre, ha a kezelést a JIMT-1 sejtekkel való oltás utáni 45. napon kezdték. Vajon van-e hatása a trastuzumabnak, ha korábban kezdjük az egerek kezelését?
- Milyen hatása van a trastuzumab kezelésnek, ha még korábban, a JIMT-1 sejtekkel való oltással azonos napon kezdjük?
- Milyen hatása van a JIMT-1 sejtekből alapított xenograftok növekedésére a két ErbB2-t keresztkötni képes, de Fc résszel nem rendelkező trastuzumab-F(ab')₂-nek?
- Hogyan változtatja a JIMT-1 xenograftok ErbB2 expresszióját a trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ kezelés?
- Új sejtvonalakat kívántunk alapítani JIMT-1 xenograftokból.
- Össze kívántuk hasonlítani a trastuzumab-érzékeny SKBR3 sejtek, a rezisztens JIMT-1 sejtek ill. az általunk alapított JIMT-1 X- és JIMT-1 X+ sejtek érzékenységét trastuzumab-közvetítette ADCC-re *in vitro*.
- Kíváncsiak voltunk arra, vajon modell-rendszerünkben ki tudunk-e mutatni a JIMT-1 primer daganatból származó, az egerek vérében és csontvelőjében lévő sejteket? Ha igen, van-e valamilyen hatása a trastuzumab kezelésnek ezek számára?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúrák és állatmodellek

Kísérleteinket ErbB2 pozitív, trastuzumab-kezelésre *in vitro* érzékeny (SKBR3, BT474) és rezisztens (JIMT-1) humán emlőrák sejtekkel végeztük.

Az állatkísérleteinkhez a DE OEC Bőrgyógyászati Klinika SCID egereit és az Institute of Medical Technology, University and University Hospital of Tampere nude egereit használtuk: 5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk fiatal, nőtény nude vagy SCID egerek bőre alá. Az egerek hetente egyszer kaptak $5 \mu\text{g/g}$ trastuzumabot vagy rizuximabot intraperitoneálisan (i.p.). A trastuzumab-F(ab')₂-t ötször nagyobb koncentrációban adtuk a teljes IgG és az F(ab')₂ *in vivo* eltérő féléletideje miatt. A kontroll egerek hetente egyszer kaptak $100 \mu\text{l}$ fiziológiás sóoldatot i.p. Az egerekben kifejlődött daganatok három kiterjedését (hossz, szélesség, magasság) hetente mértük tolómérővel, a 3 paramétert összeszorozva becsültük meg a daganatok térfogatát.

Az egerek véreztetése, a xenograft kivétele, csontvelővétel

Az egereket izofuránnal elaltattuk, majd a nyaki verőér elvágásával kivéreztettük. A vért Na-heparinnal átöblített centrifuga csövekben gyűjtöttük. Az egerekből a véreztetés után kivett daganatokat Cryomatrix-szal borítottuk és folyékony nitrogénben ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) lefagyasztottuk (ezeket a gyorsfagyasztottnak nevezett mintákat ezután $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk). A csontvelőt a combcsontok két epifízisének levágása után, a csontok PBS-sel való átmosásával gyűjtöttük.

Mononukleáris sejtek szeparálása vérből és csontvelőből

Az egerek vérének, csontvelőjének, és az egészséges emberek által adott vért eredeti térfogatuk kétszeresére hígítottuk PBS-sel, majd Ficoll sűrűséggradiens centrifugálást végeztünk. A mononukleáris sejtréteget leszívtuk, a sejteket a további kísérleteknek megfelelően készítettük elő.

AI-sejtvonalak alapítása JIMT-1 xenograftokból

A JIMT-1 X- és JIMT-1 X+ sejtvonalakat egy a kísérlet végéig fiziológiás sóval, ill. egy a kísérlet végéig trastuzumabbal kezelt egér daganatából alapítottuk. Izofuránnal végrehajtott eutanázia után az állatokból kivett daganatokat steril ollóval és szikével apró darabokra

vágtuk, steril PBS-sel kétszer mostuk, ezután Ham's F-12/DMEM-et (1:1), streptomycint L-glutamint, 20% Hyclone főtális borjú szérumot és 0.3 unit/ml inzulint tartalmazó médiumban sejtenyésztő edénybe tettük. A JIMT-1 X+ sejtek tápfolyadék 10 µg/ml trastuzumabot is tartalmazott. A halott sejteket és a törmeléket 3 nap múlva eltávolítottuk, és kicseréltük a tápfolyadékot. A konfluens sejt kultúrákat tripszin-EDTA kezeléssel vettük fel, majd 1:2 arányban új sejtenyésztő edényekbe tettük. A tápfolyadék ettől kezdve csak 10% szérumot tartalmazott. A JIMT-1 X+ sejtek a sejt vonal alapítása óta 10 µg/ml trastuzumab koncentráció mellett nőnek.

Immunhisztokémia, immuncitokémia

A cryomatrixban lefagyasztott dagantokból SHANDON AS-620E Cryotome-mal 20 µm vastagságú metszeteket készítettünk (-25 °C-on). A metszeteket szilanizált tárgylemezekre húztuk, 20 percig 4 %-os formaldehid-PBS-ben fixáltuk, kétszer mostuk PBS-ben, egyszer 1 mg/ml BSA-t (bovine serum albumin) tartalmazó PBS-ben, majd 100 µl térfogatú, 80 µg/ml antitest és 1 mg/ml BSA koncentrációjú PBS-t tettünk a mintákra. A jelölést nedveskamrában, 4 °C-on, sötétben, 1 napig végeztük. Másnap a mintákat háromszor mostuk PBS-ben, majd 15 µl Mowiol (a fluoreszcens festékek kiégését gátló anyag) rácsöppentése után fedőlemezzel lefedtük.

A vérből és a csontvelőből szeparált mononukleáris réteg sejtjeit kétszer mostuk PBS-ben, egyszer 1 mg/ml BSA-PBS-ben, majd 50 µl térfogatú, 80 µg/ml antitest és 1 mg/ml BSA koncentrációjú PBS-t adtunk hozzájuk. A jelölést jégen, 30 percig, sötétben végeztük. A mintákat ezután kétszer mostuk PBS-sel, 1 %-os paraformaldehid-PBS-sel fixáltuk, és kamrába tettük.

Antitestek

A trastuzumabot (Herceptin[®], IgG1) a Roche Magyarország Kft-től vettük. Az 528 (IgG2a) nevű, ErbB1 receptor ellenes monoklonális antitestet a HB-8509-jelű hibridóma termelte (ATCC, Manassas, VA). Az ErbB2 ellenes ErbB2-76.5 nevű antitestet (IgG1) az azonos nevű hibridóma termelte (Yosef Yarden ajándéka, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). A szintén ErbB2 ellenes 2C4 a Genentech Inc. (South San Francisco, CA) ajándéka. A HLA-I molekula nehéz láncára specifikus W6/32 (IgG2a) monoklonális antitest Francis Brodsky (University of California San Francisco, USA) ajándéka. Az egér CD45 minden izoformáját felismerő monoklonális antitestet termelő hibridóma Denis R. Alexander ajándéka (The Babraham Institute, Babraham, Cambridge, UK). Az antitesteket hibridómájuk felülűszojából

affinitás kromatográfiával tisztítottuk: protein A oszlop segítségével az egér eredetűeket (ErbB-76.5, W6/32), protein G oszlopon a patkány eredetű CD45 elles antitestet.

A fikoeritrinnel konjugált, humán IgG Fc ellenes (PE-anti human Fc, Clone: HP6043) antitestet a Leinco Technologies-től, a poliklonális, Cy3-mal vagy Cy5-tel konjugált GAHIG (H+L) Fab-t a Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.-től vettük.

Trastuzumab-F(ab')₂ fragmentum preparálása

A Trastuzumab-F(ab')₂ fragmentumot az irodalomban leírt módszer alapján preparáltuk: 20 mg trastuzumabot 20 mmol/l acetát pufferben (pH = 4.5) oldottunk fel, majd háromszor dializáltuk ugyanebbe a pufferbe Centricon-10-es csöveket használva. Az IgG-t 0.5 ml immobilizált pepszinnel emésztettük 37 °C-on 6 órán át. A reakciót 10 ml 2 mol/l Tris-sóval (pH = 8.2) állítottuk le. Az emésztett trastuzumabot 0.22 µm-es szűrőn szűrtük át, hogy az agaróz gyöngyökhöz kötött immobilizált pepszint eltávolítsuk. Ezután az emésztett mintákat Centricon-50-es csövekkel töményítettük. A trastuzumab-F(ab')₂-t az emésztetlen trastuzumabtól high-performance liquid kromatográfiával (HPLC) választottuk el Sephacryl S-300 gyantával töltött 10 × 800 mm-es oszlopon. Az oszlopot 50 mmol/l koncentrációjú Na-foszfáttal (pH = 7.0) mosva 0.5 ml-nyi frakciókat gyűjtöttünk. A frakciókból vett mintákat nem-redukáló SDS-PAGE-zsel [8%-os gélben (5.7 ml desztillált víz, 1.6 ml ProSieve 50 gel solution, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH = 8.8), 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% APS (ammónium-perszulfát), 4 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin) 14 µl-nyi mintát 6 µl, β-merkaptóetanol mentes mintapufferben (1.51 g TRIS, 20 g glicerol, 40 ml 10% SDS, 2 mg brómfenolkék, 80 ml desztillált víz) futtattuk] teszteltük. Azokat a frakciókat öntöttük össze és neveztük trastuzumab-F(ab')₂-nek, amelyek nem tartalmaztak emésztetlen trastuzumabot. A trastuzumab-F(ab')₂-t Centricon-50-es csövekkel töményítettük, 0.22 µm-es szűrővel sterilre szűrtük és -20 °C-on tároltuk.

Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

A humán, daganatos sejteket kettős célpontú FISH-val különítettük el az egér sejtektől: Egy egészséges SCID egér izomszövetéből izolált teljes genomi DNS (DNeasy Blood és Tissue Kit (QIAGEN, Budapest, Hungary)) 1 µg-ját nick translációs kit-tel (Vysis Inc., Downers Grove, IL USA) SpectrumRed-dUTP-vel (Vysis Inc.) jelöltük. Kétszáz ng jelölt, egér DNS-t összekevertünk 100 µg Cot-1 DNS-sel (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), a DNS-t standard módszerrel kicsaptuk és 10 µl hibridizációs oldatban (55 % formamide, 10 % dextrán-szulfát, 2x SCC (0,3 M NaCl, 0,03 M Na-citrát, pH = 7,0)) oldottuk fel, amely tartalmazott

1 µl, SpectrumGreen-nel jelölt, humán X kromoszóma centromérára specifikus DNS próbát (Vysis Inc.). A hibridizációs elegyet összekevertük, denaturáltuk (5 perc 70 °C-on) és 30 percig 37 °C-on inkubáltuk a próba kötődésének megkönnyítése érdekében

Az egerek véréből vagy csontvelőjéből sűrűséggradiens centrifugálással gyűjtött mononukleáris sejteket metanol:ecetsav 3:1 arányú elegyével fixáltuk, tárgylemezre csöppentettük, levegőn megszárítottuk, denaturáltuk (70 % formamide, 2x SCC, 3 perc 73 °C-on), felszálló alkoholsorral dehidratáltuk (70 %, 85 %, 100 %), 0,25 µg/ml proteináz K-t (Sigma) és 2mM CaCl₂-ot tartalmazó 20 mM-os TRIS pufferrel (pH = 7,5) kezeltük (7,5 perc 37 °C-on), majd újra dehidratáltuk; végül a sejtekhez adtuk a fent leírt módon előkészített hibridizációs elegyet. A mintákat egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, a nem kötődő DNS próbákat 45°C-os hibridizáló oldattal távolítottuk el (3 mosás). Végül 15 µl Vectashieldben (Vector USA) (a fluoreszcens festékek kiégését gátló anyag) oldott DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vysis) (0.3 µg/ml) rácsöppentése után fedőlemezzel fedtük a mintákat.

Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH-val „festett” sejtekről egy ZEISS Axioplan (Zeiss, Germany) fluoreszcens mikroszkóp 100-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,4) olajimmerziós objektívvel készítettük a felvételeket. A gerjesztő fény (fényforrás: 100 W-os higanygőzlámpa) hullámhosszát megfelelő optikai szűrők alkalmazásával változtattuk. Emissziós szűrőnek a Pinkel-féle háromszoros sávszűrős emissziós filterblokkot használtuk, mely alkalmas a kéken fluoreszkáló DAPI, a zölden fluoreszkáló spektrum zöld és a pirosan fluoreszkáló spektrum red megjelenítésére is. A fluoreszcens képek rögzítésére a METASystem (Germany) által forgalmazott, FISH analízisre kifejlesztett munkaállomást alkalmaztuk (ISIS, Metasystem GmbH, Germany). A fluoreszcens képek rögzítése az általunk beállított expozíciós idővel történt nagy felbontású CCD (Charge Couple Device) kamera segítségével.

Konfokális mikroszkópia

A gyorsfagyasztott metszetekről és a kamra aljára ülepedett keringő daganatos sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük a felvételeket egy 63-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,4) olajimmerziós objektívvel. Az Alexa488 fluoreszcens festéket az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 505-530 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az Alexa546 és a Cy3 festékeket a He-Ne lézer 543 nm-es vonalával gerjesztettük, az emissziójukat pedig egy 560-615 nm-es sávszűrőn

keresztül detektáltuk. Az Alexa647 festéket a He-Ne lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 650 nm-es felüáteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. A transzmissziós felvételek készítéséhez a He-Ne lézer 633 nm-es vonalát használtuk.

Az ADCC *in vitro* vizsgálata

Az egészséges, humán donorokból Ficoll sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejteket (*effektor sejtek*) 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben vettük fel. A növekedésük exponenciális szakaszában lévő JIMT-1, JIMT-1 X-, JIMT-1 X+ és SKBR3 sejteket (*target sejtek*) tripszin-EDTA (0,05% tripszin, 0,02% EDTA) kezeléssel vettük fel, egyszer mostuk 1 mg/ml BSA-PBS-ben, majd 10 µmol/l koncentrációjú 5-,6-karboxofluorescein diacetát, szukcinimidil észterrel (CFDA-SE) jelöltük (37 °C, 10 perc). A daganatos sejteket ezután háromszor mostuk 10% FCS-t és 1% BSA-t tartalmazó DMEM-mel, hogy eltávolítsuk a nem kötődött CFDA-SE-t. A mosások között 5-5 percig 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Végül a jelölt target sejteket 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben vettük fel és 2:1, 6:1, 15:1, 30:1 és 60:1 effektor/target (E/T) arányban kevertük össze az effektor sejtekkel. A mintákhoz 100 µg/ml-es koncentrációban trastuzumabot, trastuzumab-F(ab')₂-t vagy rituximabot adtunk. 8 órás 37 °C-on történő inkubálás után a halott sejteket propidium-jodiddal festettük. A mintákat egy FACScan áramlási citométerrel mértük le. Mintánként 10 000 sejt fluoreszcens jelét detektáltuk: a CFDA-SE-t és a PI-ot is az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az előbbi emisszióját egy 530±30 nm-es sávszűrőn keresztül az FL-1 csatornában, az utóbbiét egy 630±22 nm-es sávszűrőn keresztül az FL-3 csatornában detektáltuk, logaritmikus módban. Minden mintához készítettünk negatív kontrollt, amely ugyanúgy készült, mint a minta, kivéve, hogy effektor sejteket nem tettünk bele. A pozitív kontrollokban a sejteket 4%-os paraformaldehid-PBS-sel öltük meg. A megölt target sejtek százalékát az alábbi képlettel számítottuk ki: (élő target sejtek százaléka a negatív kontrollban – élő target sejtek százaléka a mintában) / élő target sejtek százaléka a negatív kontrollban.

Az *in vitro* trastuzumab-érzékenység vizsgálata

Alamar Blue (resazurin) módszerrel vizsgáltuk a trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ hatását a JIMT-1, SKBR3 és BT474 sejtek életképességére. A növekedésük exponenciális szakaszában lévő sejteket tripszin-EDTA kezeléssel vettük fel, és 96 lyukú, lapos aljú sejtenyésztő lemez lyukaiba tettünk sejtvonaltól függően 4500-8000 darab sejtet. A sejtvonalnak megfelelő sejtenyésztő folyadékot egy napos tenyésztés után kicseréltük 0, 1, 10

ill. 100 µg/ml trastuzumab vagy trastuzumab-F(ab')₂ koncentrációjú médiumra. 72 órás tenyésztés után a mintákhoz 20 µl AlamarBlue-t cseppentettünk; a fluoreszcencia intenzitást 5 óra múlva dekektáltuk Wallac Victor2 plate olvasóval 544 nm-es gerjesztési és 590 nm-es emissziós hullámhosszon.

A konfokális mikroszkóppal felvett képek elemzése

A konfokális mikroszkópos képeket a Matlab alatt futó DipImage programmal elemeztük. A kép szegmentálása során a sejtmembránhoz tartozó pixeleket egy általunk írt program segítségével azonosítottuk, amely a szemi-automatikus „watershed” algoritmuson alapult. A fluoreszcencia intenzitásokat csak a sejtmembrán pixelek által alkotott maszkhoz tartozó területen határoztuk meg. Az így kiszámított membránfluoreszcencia-intenzitás értékéből levontuk a háttér intenzitását, amelyet egy látható fluoreszcens jelölődést nem mutató terület fluoreszcencia intenzitás átlagaként határoztunk meg.

Statisztika

Az adatok átlagát ± SEM ábrázoltuk. A minták közötti statisztikai különbséget Student féle kétmintás t próbával vizsgáltuk, abban az esetben, ha a két minta szórása megegyezett (F-próba). Az eltéréseket 5%-os szignifikancia szint mellett vizsgáltuk ($P < 0.05$).

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

Korai trastuzumab kezelés hatása a JIMT-1 xenograftokra

A *Bevezetésben* említettem, hogy finn kollaborációs partnerünk egy 62 éves, mellrákos nőbeteg mellüregi daganatos folyadékgyüleméből alapította a JIMT-1-nek elnevezett sejtvonalat. A beteg, daganatának ErbB2 pozitivitása ellenére klinikailag rezisztens volt trastuzumabra. Az ErbB2 pozitív JIMT-1 sejtek *in vitro* és *in vivo* rezisztensnek bizonyultak trastuzumab kezelésre. Mivel az *in vivo* kísérletet úgy végezték el, hogy a JIMT-1 sejtekkel oltott egereket az oltás utáni 45. napon kezdék el trastuzumabbal kezelni (a daganatok térfogata ekkor 200 – 500 mm³ volt), kíváncsiak voltunk, vajon van-e valamilyen hatása a trastuzumabnak akkor, ha korábban, kisebb daganatméretnél kezdjük el az egerek kezelését.

5 × 10⁶ darab JIMT-1 sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egér bőre alá. A daganatos sejtekkel való oltás utáni 9. napon, amikor a daganatok térfogata 100 – 200 mm³ volt, 8 egeret fiziológiás sóoldattal, 8 egeret pedig 5 µg/g trastuzumabbal kezdtünk el kezelni. A kezelést a kísérlet végéig folytattuk. Meglepetésünkre a trastuzumabbal kezelt egerekben lassabban növekedtek a daganatok: a trastuzumab a kísérlet 16. és 44. napja között a fiziológiás sóval kezelt egerekhez képest szignifikánsan csökkentette a daganatnövekedést.

A trastuzumab kezelés hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre

Mivel a trastuzumab a már xenografttá alakult, de még kisméretű daganatok növekedését részben gátolta, logikus volt a következő kérdés feletétele: milyen hatása van a trastuzumab kezelésnek akkor, ha még korábban kezdjük?

5 × 10⁶ darab JIMT-1 sejtet oltottunk 14 fiatal, nőstény nude egér bőre alá. Az egereket a daganatsejtekkel való oltással azonos napon (0. nap) kezdtük kezelni: 7 egeret rituximabbal, 7 egeret trastuzumabbal. A rituximabot (humán CD20 ellenes, humanizált, monoklonális antitest) negatív kontrollként használtuk: a JIMT-1 sejteken nincs CD20, az egér CD20 receptoraihoz pedig az egér és az ember CD20 receptora közti 16 aminosavnyi különbség miatt nem kötődik a rituximab.

Kísérletünkben mind a 7 rituximabbal kezelt egérben kifejlődött xenograft, viszont csak 7-ből 2 trastuzumabbal kezelt egérben észleltünk daganatot. A trastuzumab kezelést a kísérlet 42. napján leállítottuk, amikor egyértelművé vált a daganatgátló hatása: a trastuzumab a kísérlet 21. és 42. napja között szignifikánsan csökkentette a daganatnövekedést a kontroll egerekhez képest. Fontos megjegyezni, hogy abban a 2 egérben, amelyekben a trastuzumab

kezelés ellenére kifejlődött daganat, a kezelés leállítása után a daganatok növekedésnek indultak (7. ábra, a nyilak a kezeléseket mutatják).

A kísérletet megismételtük SCID egerekkel:

5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egér bőre alá. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük. Bár jóval lassabban, mint a kontroll egerekben, de mind a 8 trastuzumabbal kezelt egérben növekedésnek indultak a daganatok. A növekedés azonban a 14. napra megállt, sőt, a daganatok mérete csökkenni kezdett: a 28. napon a méretük minimális volt, 8-ból három egérben nem is tudtunk daganatot tapintani. Ezután a daganatok ismét növekedni kezdtek, a 35. naptól a növekedésük exponenciális volt. A 63. napon a trastuzumabbal kezelt egerek felének kezelését leállítottuk: nem tapasztaltunk különbséget a trastuzumabot tovább kapó (folyamatos trastuzumab) és a trastuzumabot többé nem kapó (felfüggesztett trastuzumab) egerek daganatainak növekedésében. Ez azt bizonyította, hogy a 63. naptól a daganatok növekedését egyáltalán nem befolyásolta a trastuzumab. Az, hogy kísérlet 71. napjáig (a 14. naptól) a trastuzumabbal kezelt egerek daganatainak mérete szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll egereké, a trastuzumab első 6 héten át kifejtett gátló hatásának a következménye.

Kísérleteink alapján a trastuzumab-rezisztencia következő formáit különíthetjük el: klinikai rezisztencia, *in vitro* rezisztencia, *in vivo* részleges és teljes rezisztencia, *in vivo* teljes és részleges érzékenység, *in vivo* teljes, szerzett rezisztencia. Mesterkéltnek tűnhet a rezisztencia milyenségének ilyen mértékű tárgyalása, ám hisszük, hogy mégsem az: Úgy gondoljuk, hogy a trastuzumab-rezisztencia komplex fogalom, amelyet nem lehet egyszerűen „van”-nak, vagy „nincs”-nek felfogni, még ugyanannak a daganatnak az esetében sem. A beteg, akinek a mellüregi folyadékgyüleméből a JIMT-1 sejtvonalat alapították, *klinikailag rezisztens* volt trastuzumab kezelésre. A JIMT-1 sejtek *in vitro* teljesen *rezisztensek* voltak, *in vivo* viszont megfigyeltük a rezisztenssé válás egész folyamatát: a *teljes érzékenységtől* a *részleges érzékenységen* keresztül egészen a *teljes rezisztenciáig*.

A trastuzumab-F(ab')₂ kezelés hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre

A fent megbeszélt eredményeink alapján a következő elméletet állítottuk fel: Általánosságban igaz, hogy a trastuzumab *in vitro* hatásáért az antitest ErbB2-höz kapcsolódásával elindított folyamatok vezetnek. De mert a JIMT-1 sejtekre a trastuzumab *in vitro* teljesen hatástalan, úgy gondoljuk, hogy az antitest *in vivo* daganatnövekedést gátló hatásáért nem az antitest ErbB2-höz kapcsolódó Fab része, hanem az Fc része a felelős.

Elméletünk szerint az Fc-receptorral rendelkező immunsejtek (NK sejtek, neutrofil granulociták, monociták, makrofágok), amelyek működőképesek nude és SCID egerekben is, ölik meg a daganatsejteket trastuzumab közvetítette ADCC-vel. Ha mindez igaz, akkor a trastuzumabnak *in vivo* hatástalanná kell válnia, ha Fc részét eltávolítjuk. Az elméletünk bizonyítására megfelelő mennyiségű és minőségű trastuzumab-F(ab')₂-t kellett előállítanunk.

5 × 10⁶ darab JIMT-1 sejttel oltottunk 24 fiatal, nőstény SCID egeret. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal, 8-at trastuzumab-F(ab')₂-vel kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük. A kísérlet pozitív kontrolljaként trastuzumabbal kezelt egerekben a daganatok hasonlóan viselkedtek, mint azt a korábbiakban megfigyeltük: méretük a 4-5. hétig alig változott, azután exponenciális növekedésnek indultak. A trastuzumab kezelés a kísérlet 2. és 6. hete között szignifikánsan csökkentette a daganatok méretét a fiziológiás sóval kezelt egerekhez képest. Viszont a trastuzumab-F(ab')₂-nek semmilyen hatása nem volt a daganatnövekedésre: az F(ab')₂ fragmentumokkal kezelt egerekben ugyanolyan ütemben növekedtek a daganatok, mint a sóoldattal kezeltékben.

„Al-sejtvonalak” alapítása a JIMT-1 xenograftokból

Egy kontroll, sóoldattal kezelt egér és egy a kísérlet végéig trastuzumabbal kezelt egér JIMT-1 xenograftjából sejtvonalat alapítottunk: a két sejtvonalnak a *JIMT-1* X- és a *JIMT-1* X+ nevet adtuk. Az „X” a xenografra utal, a „-”, és a „+” pedig arra, hogy az egér nem kapott vagy kapott trastuzumab kezelést. A JIMT-1 X+ sejtek sejtenyésztő folyadéka a sejtvonal alapítás óta 10 µg/ml koncentrációjú trastuzumabot tartalmaz.

In vitro ADCC vizsgálata trastuzumab érzékeny és rezisztens sejtvonalokon

Fenti kísérletünkben a daganatok *in vivo* növekedését a trastuzumab gátolta, de a trastuzumab-F(ab')₂ nem. Feltételezésünk szerint ennek az az oka, hogy a SCID egerek immunsejtjei képesek ADCC-vel elpusztítani a JIMT-1 daganatsejteket, azok intrinzik trastuzumab rezisztenciája ellenére. Ha az elgondolásunk helyes, akkor a daganatsejteknek *in vitro* is érzékenynek kell lenniük ADCC-vel szemben.

Kísérletünkben egészséges humán donorok véréből izolált mononukleáris sejteket használtunk effektor sejtneként, a targetek pedig a JIMT-1, JIMT-1 X-, JIMT-1 X+ és az SKBR3 daganatsejtek voltak. Minden sejtvonal esetén vizsgáltuk a sejtlés mértékét trastuzumab, trastuzumab-F(ab')₂ és rituximab jelenlétében.

A kontroll rituximabot és a trastuzumab-F(ab')₂-t tartalmazó mintákban kevés daganatsejt pusztult el, nem volt szignifikáns különbség a két szer jelenlétében mért sejtlés között.

Viszont a trastuzumabot tartalmazó mintákban (azokban az esetekben, amikor az effektor : target arány 15 vagy annál több volt) minden sejtvonalnál szignifikánsan nagyobb volt a sejtölés, mint trastuzumab-F(ab')₂ jelenlétében. Trastuzumab jelenlétében a sejtölés annál nagyobb volt, minél nagyobb volt az effektor : target (E:T) arány, maximumát (~ 50-60%-os sejtölést) a legnagyobb, 60:1-es E:T aránynál érte el.

Kísérletünk tanúsága szerint a trastuzumab által kiváltott/közvetített ADCC-re egyformán érzékeny volt a trastuzumabra érzékeny SKBR3, a trastuzumab rezisztens JIMT-1 és a két JIMT-1 xenograftból alapított sejtvonal.

Érzékenyek-e a JIMT-1 X+ sejtek trastuzumab-kezelésre *in vivo*?

Mivel a trastuzumab mellett növekvő, trastuzumabra rezisztenssé vált xenograftból alapított JIMT-1 X+ sejtek *in vitro* érzékenyek bizonyultak trastuzumab-közvetítette ADCC-re, felmerült a kérdés: vajon hogyan reagálnak a JIMT-1 X+ sejtek a trastuzumab kezelésre *in vivo*?

5 × 10⁶ darab JIMT-1 X+ sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egérbe. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük. Az X+ daganatok növekedését a trastuzumab kezelés szignifikánsan gátolta a kísérlet 7. és 35. napja között. Érdekes, hogy az X+ daganatok trastuzumab-rezisztenciája hamarabb kifejlődött, mint a JIMT-1 daganatoké; az is megfigyelhető azonban, hogy az X+ daganatok a sóoldattal kezelt egerekben is gyorsabban nőttek, mint a JIMT-1 daganatok. Úgy gondoljuk, hogy az általunk alapított JIMT-1 X+ sejtek *in vivo* jobban adaptálódtak az egér szöveti környezethez, ezért növekedtek gyorsabban mind a sóoldattal, mind a trastuzumabbal kezelt egerekben, mint a JIMT-1 daganatok.

Clynes és mksai a *Bevezetés*ben említett trastuzumabra *in vitro* érzékeny BT474 sejtekkel végzett kísérleteikben megállapították, hogy a trastuzumabnak a BT474 sejtekre kifejtett gátló hatásának mintegy 2/3 részéért az ADCC a felelős. Úgy gondoljuk, hogy a trastuzumabra *in vitro* rezisztens JIMT-1 sejtek *in vivo* trastuzumab-érzékenységét teljes mértékben az antitest által közvetített ADCC okozza.

A trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ kezelés is csökkentette az ErbB2 expressziót a JIMT-1 xenograftokon

Mint a *Bevezetés*ben említettem, a trastuzumab daganatgátló hatásában fontosnak tartják azt, hogy az antitest csökkenti az ErbB2 szintet. Kíváncsiak voltunk, vajon a mi *in vivo*

modell-rendszerünkben hogyan hatott a trastuzumab- és a trastuzumab-F(ab')₂-kezelés a xenograftok ErbB2 expressziójára.

Gyorsfagyasztott metszeteket készítettünk a fiziológiás sóval, trastuzumab-F(ab')₂-vel, a kísérlet végéig trastuzumab-kezelést kapó (folyamatos trastuzumab) és 9 hétig trastuzumabot kapó, majd 6 héten keresztül kezelést nem kapó (felfüggesztett trastuzumab) egerek daganataiból. A trastuzumabbal nem kompetáló, Cy3 fluoreszcens festékhez kapcsolt, ErbB2-76.5 jelű, ErbB2 ellenes antitesttel festett metszetekről konfokális mikroszkóppal, azonos beállításokkal készített felvételeken végeztük el a membránfluoreszcencia kvantitatív analízisét: a folyamatos trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ kezelés ugyanolyan hatékonyan csökkentette az ErbB2 szintet. A trastuzumab kezelés leállítását követően az ErbB2 mennyisége nőtt a sejteken: 6 héttel az utolsó trastuzumab kezelés után a sejtek ErbB2 expressziója csaknem ugyanakkora volt, mint a sóoldattal kezelt kontroll egerekből származó xenograftokban.

A trastuzumab-F(ab')₂-kezelés csökkentette az ErbB2 expressziót, a daganatnövekedést mégsem gátolta. Ezért úgy gondoljuk, hogy modell-rendszerünkben a trastuzumab nem az ErbB2 expresszió csökkentésén keresztül gátolta a daganatnövekedést: szétválasztottuk a trastuzumab ErbB2 szintet csökkentő és daganatnövekedést gátló hatását.

A trastuzumab-kezelés leállítását követően 6 héttel trastuzumab a sejteken?

Az alábbiakban egy mellékletként kapott, érdekes eredményünkről számolok be. A fiziológiás sóval, folyamatosan trastuzumabbal ill. 9 hétig trastuzumabbal, majd 6 hétig semmivel nem kezelt egerek xenograftjaiból készített gyorsfagyasztott metszeteket Cy3 fluoreszcens festékhez kapcsolt humán IgG ellenes antitesttel festettük. A mintákról konfokális mikroszkóppal, azonos erősítésekkel felvett képeken látszik, hogy 6 héttel a kezelés leállítását követően egyes sejtcsoportokon nagy mennyiségben található trastuzumab, más sejteken viszont egyáltalán nincs, vagy alig van.

A trastuzumab féléletideje *emberben* 18-27 nap, így az talán nem meglepő, hogy a kezelés leállítását követően 42 nappal kimutattuk a trastuzumab jelenlétét *egérben* növekvő humán daganatokban. Az viszont annál furcsább és érdekesebb, hogy a trastuzumab milyen egyenlőtlenül oszlik el a sejteken: a legtöbb sejten alig mutatható ki, egyes sejtcsoportokon viszont nagyon sok van. Mindennek a miértjét és a jelentőségét egyelőre csak találgatni tudjuk.

Vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) kimutatása JIMT-1 sejtekkel oltott SCID egerekben

Kíváncsiak voltunk arra, hogy JIMT-1 – SCID egér modell-rendszerünkben ki tudunk-e mutatni az egér vérében keringő, a xenograftból leszakadt, humán daganatsejteket.

Immunfluoreszcenciával: Amikor a daganatok mérete elérte az 1000 mm^3 -t izofuránnal elaltattuk az egereket, majd a nyaki ütőerük átvágásával kivéztettük őket. A vérből sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejtek egy részét inkubáltuk Alexa488 fluoreszcens festékhez kapcsolt, humán MHC-I ellenes monoklonális antitest Fab fragmentumaival és Alexa546 festékhez kapcsolt, egér pan-CD45 ellenes monoklonális antitesttel. Módszerünkkel egyértelműen meg tudtuk különböztetni az MHC-I-gyet expresszáló humán VKDS-eket a CD45 pozitív egérsejtektől.

Fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH): Az egerek véréből szeparált mononukleáris sejtek másik részén metanol : ecetsavas fixálás után kettős célpontú FISH-t végeztünk. A spectrum green-nel festett humán X kromoszóma ellenes próbával jelölt keringő JIMT-1 daganatsejteket jól meg tudtuk különböztetni a spectrum red-del festett egér DNS próbával jelölt egér sejtektől.

A trastuzumab hatása a vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) és csontvelői, disszeminált daganatsejtek (CSDDS) számára

Rendszerünk alkalmasnak látszott az egerek vérében keringő daganatos sejtek kimutatására, így meg kívántuk vizsgálni, hogy vajon van-e hatása a trastuzumab-kezelésnek az egerek vérében keringő (és csontvelőjébe disszeminált) JIMT-1 sejtekre, akkor, amikor a primer daganat már rezisztens trastuzumabra.

A trastuzumab és a rituximab hatása a xenograftá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre: 5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk fiatal, nőstény SCID egerek bőre alá. Az egereket a daganatos sejtekkel való oltás napján kezdtük kezelni fiziológiás sóoldattal, trastuzumabbal vagy rituximabbal. A trastuzumabnak a korábban megfigyeltékhez hasonló daganatnövekedést gátló hatása volt: a kísérlet 21. napjáig minden trastuzumabbal kezelt egérben (8 db) csökkent a daganat mérete, majd a 28. naptól exponenciálisan kezdtek növekedni a daganatok. A trastuzumab szignifikánsan gátolta a daganatnövekedést a 14. naptól a 42. napig. Meglepetésünkre a rituximabbal kezelt egerekben jobban növekedtek a daganatok, mint a sóoldattal kezeltékben, jóllehet az eltérés nem volt szignifikáns.

A trastuzumab és a rituximab hatása a vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) és a csontvelői, disszeminált daganatsejtek (CSDDS) számára: Amikor fenti kísérletünkben a

daganatok térfogata elérte a $\sim 800 \text{ mm}^3$ -t (a sóoldattal és a rituximabbal kezelt egerek esetén a kísérlet 42. napján, trastuzumab kezelésnél az 56. napon), kivéztettük az egereket és csontvelőt vettünk a combcsontjaikból. A vérből és a csontvelőből sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejteket fluoreszcens festékekhez kapcsolt humán ErbB1, ErbB2 és MHC-I ellenes monoklonális antitestek Fab fragmentumaival jelöltük. (Gyakran előfordul, hogy a daganatsejtekről hiányzik egy, a vizsgáló általi azonosításért felelős antigén. Ez téves negatív eredményhez vezethet. Sokkal kisebb annak a valószínűsége, hogy egyszerre 3 marker is hiányzik a sejtekről: ezért használtunk 3 különböző receptor ellen antitestet.) A sóoldattal, a rituximabbal és a trastuzumabbal kezelt egerekben is ki tudtunk mutatni VKDS-eket és CSDDS-eket. Azonban míg minden sóoldattal (8/8) és rituximabbal (7/7) kezelt egérben voltak VKDS-ek és CSDDS-ek is, csak 8-ból 3 trastuzumabbal kezelt egér csontvelőjében és csak 8-ból 2 trastuzumabbal kezelt egér vérében találtunk daganatos sejteket. A trastuzumab kezelés szignifikánsan csökkentette a VKDS-ek és a CSDDS-ek számát a sóoldattal kezelt egerekben találtakhoz képest.

Érdekes, hogy míg a sóoldattal és a trastuzumabbal kezelt egerek csontvelőjében nem találtunk több daganatsejtből álló mikrometasztázisokat, 7-ből 5 rituximabbal kezelt egér csontvelőjében találtunk: 4 egérben egy-egy mikrometasztázist (3, 3, 3 ill. 6 sejtől álltak), egy egérben pedig hármat (6, 7 ill. 16 sejtől álltak). Sőt, az egyik rituximabbal kezelt egér vérében találtunk egy 9 sejtől álló keringő, többsejtes daganatsejt-aggregátumot (KTDA). Sem a sóoldattal, sem a trastuzumabbal kezelt egerek vérében nem találtunk KTDA-ot.

A dolgozatomban leírt és megbeszélte megfigyeléseinket a következő elmélettel próbáljuk magyarázni:

Úgy gondoljuk, hogy az egyedülálló vagy a nem megfelelően érett daganatszöveté fejlődött JIMT-1 sejtek (in vitro sejtszuspenzió, kis daganatméretnél vagy a 0. napon kezdett trastuzumab-terápia, keringő/disszeminált daganatsejtek) érzékenyek a trastuzumab-közvetítette ADCC-re. Érett daganatszöveté fejlődve (későn kezdett trastuzumab terápia, 0. napon kezdett terápia 5-7. hetére kifejlődött rezisztencia) a sejtek elvesztik az érzékenységüket, de azok a sejtek, amelyek kikerülnek a szöveti szerkezetből, újra érzékenyek lesznek (JIMT-1 X+ sejtek in vitro és in vivo, keringő és disszeminált daganatsejtek). Munkacsoportunk és mások is felvetették korábban, hogy egyes molekulák (MUC4, hialuronsav) képesek lehetnek eltakarni az ErbB2 receptort, így a trastuzumab kevésbé fér hozzá. Mivel a JIMT-1 xenograftok sejtjeihez jól és egyenletesen kötődött a trastuzumab (gyorsfagyasztott metszetek jelölésével igazoltuk), úgy gondoljuk, hogy a „maszkoló” molekulák az ErbB2-trastuzumab

komplexet takarhatják el az Fc receptorral rendelkező immunsejtek elől. Az epitéliális - mezenhimális átalakulás során a daganatsejtek elveszítik kötőszöveti és sejt-sejt kapcsolataikat, sejt felszíni receptormintázatuk jelentősen megváltozik. Ezáltal képessé válnak arra, hogy vándoroljanak és a keringésbe lépjenek, viszont, elgondulásunk szerint, az átalakulással megszűnik a trastuzumab Fc részének elrejtése az immunsejtek elől, így a sejtek a trastuzumab-kötött ErbB2-n keresztül újra érzékennyé válnak az ADCC-re.

Amennyiben a „maszkírozós” elméletünk helyes, azonnal felvetődik két kérdés: Hogyan jön létre a maszkírozás? Mi/mik lehetnek a maszkírozó molekula/ák? Az első kérdést rögtön két részre bontanám: vajon a trastuzumab-ErbB2 komplexet a daganatsejtek valamilyen aktív védekezési mechanizmus részeként takarják el, vagy amikor a daganatsejtek 3 dimenziós szöveti struktúrába nőnek, a sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok kialakulásának mintegy melléktermékeként, „spontán” fedi be valami. Eredményeinket átgondolva az utóbbi feltételezést valószínűbbnek tartom.

Hogy mi lehet a maszkírozó molekula? A fentebb gyanúba kevert MUC4 és hialuronsav mellett gyakorlatilag bármelyik sejt-sejt ill. a sejt-mátrix kapcsolatban résztvevő molekula, amely közel kerül az ErbB2-höz.

A fenti elmélet alternatívája lehet az alábbi két, meglehetősen eddig hiányosan tárgyalt mechanizmus, amelyek megemlíttése nélkül nem fejezhetem be a dolgozatomat:

Ismert, hogy a daganatok képesek immunszuppresszív mediátorokat termelni. Mimura és mksai leírták, hogy a TGF- β -t termelő sejtek ErbB2 pozitivitásuk ellenére jóval kisebb mértékben érzékenyek a trastuzumab-közvetítette sejtölésre, mint az ErbB2-t hasonló mértékben kifejező, de TGF- β -t nem termelő sejtek. TGF- β -t semlegesítő antitesttel való kezelés után az ellenálló sejtek érzékennyé váltak a trastuzumab-közvetítette sejtölésre. Vajon a mi rendszerünkben nem hasonló mechanizmussal, az immunrendszer gyengítésével váltak ellenállóvá a daganatsejtek? Mindennek kielégítő bizonyítása kétféleképpen lehetséges: 1). ha JIMT-1 sejtekkel oltott egerekben ki tudnánk mutatni valamilyen, a daganatsejtek által termelt immunszuppresszív mediátort¹, és ezen mediátor megjelenése egybeesne (ill. valamivel megelőzné) a trastuzumab-rezisztencia kialakulását; 2). ha a rezisztenssé vált egerekből izolált immunsejtek *in vitro* kevésbé hatékonyan válnának ki ADCC-t, mint a kontroll egerek immunsejtjei. Megjegyzem, hogy az egerek immunrendszerének gyengülése/kimerülése ellen

¹ Előzetes eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az egerekbe oltott JIMT-1 sejtek képesek TGF- β -t termelni, azonban ez függetlennek látszik a trastuzumab-kezeléstől. Természetesen számos egyéb immunszuppresszív mediátor is gátolhatja az ADCC effektor sejtjeit.

szól az a tény, hogy a trastuzumab képes volt a keringő és disszeminált daganatsejtek számát csökkenteni akkor, amikor a primer daganat már rezisztenssé vált.

A trastuzumab hatásmechanizmusában fontosnak tartják a komplement-közvetítette sejtölést (CDC) is. Clynes és mksai kísérletében az ép Fc γ R-ral rendelkező egerekben a trastuzumab meggátolta a trastuzumabra *in vitro* érzékeny BT474 sejtek növekedését, az Fc γ R-defektussal rendelkező egerekben viszont a növekedésgátló hatásának mintegy 2/3-át elveszítette. Ebben a modell-rendszerben tehát a trastuzumab hatásának mintegy 2/3-áért az ADCC a felelős, a maradék 1/3-ért eddig a trastuzumab által az ErbB2-n keresztül kiváltott folyamatokat okoltuk: természetesen ebbe az 1/3-nyi részbe a CDC is beleszólhat. A CDC minden bizonnyal fontos volt a mi kísérleteinkben is, azonban az *in vitro* ADCC-t vizsgáló kísérleteink alapján úgy gondolom, hogy döntő szerepe az ADCC-nek volt.

Végül szeretném még egyszer felhívni a figyelmet arra, hogy a trastuzumab olyan esetben csökkentette a keringő és disszeminálódott daganatsejtek számát, amikor a primer daganat növekedését már nem gátolta. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a trastuzumab-kezelésnek kedvező hatása lehet olyan betegeknél is, akiknek a primer daganata rezisztens (legyen a rezisztencia akár intrinzik, akár szerzett) trastuzumab-kezelésre; különösen azt figyelembe véve, hogy a sejtciklus nyugvó fázisában lévő keringő/disszeminált daganatsejtekre a legtöbb kemoterápiás szer nem hat, míg, ha ErbB2 pozitívak, a trastuzumab képes lehet ADCC-n keresztül az immunsejtekkel megöletni őket.

ÖSSZEFOGLALÁS

Irodalmi adatok szerint a trastuzumab-érzékeny sejtvonalak esetén a trastuzumab *in vivo* hatásának mintegy 2/3-ért az immun-mediált mechanizmusok a felelősek. Az általunk használt JIMT-1 sejtvonal jelenleg egyedülálló² modell, amellyel egyszerre, elkülönítve lehet vizsgálni a trastuzumab-rezisztencia direkt (*in vitro*) és immun-mediált formáját (*in vivo*). Jelen dolgozatban főleg az utóbbi kérdéssel foglalkoztunk.

Megmutattuk, hogy az *in vitro* trastuzumab-rezisztens JIMT-I sejtek *in vivo* érzékenyek a korán kezdett trastuzumab kezelésre.

Trastuzumab-F(ab')₂-vel végzett *in vivo* kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a JIMT-1 xenograftok növekedését a trastuzumab-közvetítette ADCC gátolja *in vivo*. A trastuzumab hatásáért kizárólag az ADCC a felelős. A rezisztencia kialakulása ez esetben a trastuzumab-közvetítette ADCC-vel szembeni rezisztencia kialakulását jelenti.

Az ADCC *in vitro* vizsgálatával megmutattuk, hogy az *in vitro* trastuzumab-érzékeny és az *in vitro* rezisztens sejtvonalak ugyanolyan mértékben érzékenyek a trastuzumab-közvetítette ADCC-re *in vitro*. *In vitro* ADCC-re érzékenyek találtuk az ADCC-re *in vivo* rezisztenssé vált xenograftból alapított JIMT-I X+ sejtvonalat is. A JIMT-1 X+ sejtek egerekbe oltva *in vivo* is érzékenyek bizonyultak, bár a rezisztencia gyorsabban kialakult, mint a JIMT-1 sejteknél.

A trastuzumab-F(ab')₂ és a trastuzumab azonos mértékben csökkentette a xenograftok ErbB2 szintjét. Így, mivel az F(ab')₂ a daganatnövekedésre nem hatott, szétválasztottuk a trastuzumab ErbB2-t csökkentő és daganatnövekedést gátló hatását.

² Az egyedülállóság mellett, hogy munkánk értékét növeli, egyben gyengíti/megkérdőjelezi az eredményeinkből levonható következtetések általánosságát, hiszen kérdéses, vajon mennyire érvényesek a JIMT-1 sejtekkel tapasztaltak más sejtvonalak vagy betegek esetében. Mindezek miatt kezdtünk foglalkozni egy másik, a JIMT-1-nél is újabban alapított, ErbB2 pozitív, trastuzumab rezisztens mellrák sejtvonallal. Az első eredményeinkből készült kéziratot, melyben ezen sejtvonal immunhisztokémiai és citogenetikai karakterizálását végeztük el, hamarosan benyújtjuk közlésre.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezéshez felhasznált közlemények

- ^{1.} **Barok M.**, Isola J., Pályi-Krekk Zs., Nagy P., Juhász I., Vereb Gy., Kauraniemi P., Kapanen A., Tanner T., Vereb Gy., Szöllősi J.: Trastuzumab causes ADCC-mediated growth-inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (2007): 2065-2072. **IF: 5,131**
- ^{2.} **Barok M.**, Balázs M., Nagy P, Rákósy Zs., Treszl A., Tóth E., Juhász I., Park J.W., Isola J., Vereb Gy., Szöllősi J.: Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor. *Cancer Letters*, *közlésre elfogadva* **IF: 3.277**

Egyéb közlemények

- ^{1.} Pályi-Krekk Zs, **Barok M.**, Isola J., Tammi M., Szöllősi J., Nagy P.: Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalization in trastuzumab resistant breast cancer. *European Journal of Cancer*, 2007 Sep 30. **IF: 4,167**
- ^{2.} Rákósy Zs., Vizkeleti L., Ecsedi S., Voko Z., Bégány A, **Barok M.**, Krekk Zs., Gallai M., Szentirmay Z., Ádány R., Balázs M.: EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *International Journal of Cancer* 2007 Oct 15;121(8):1729-37. **IF: 4,693**
- ^{3.} Pályi-Krekk Zs, **Barok M.**, Kovács T., Saya H., Nagano O., Szöllősi J., Nagy P.: EGFR and ErbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate CD44 shedding. *elbírálás alatt*
- ^{4.} **Barok M.**, Balázs M., Lázár V., Rákósy Zs., Tóth E., Treszl A., Park J.W., Vereb Gy., Szöllősi J.: Characterization of a trastuzumab resistant novel breast cancer cell line by CGH and FISH. *kézirat*