

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A CD44 SZEREPE TRASTUZUMAB REZISZTENS EMLÓTUMORBAN

Pályi-Krekk Zsuzsanna



Debreceni Egyetem
Orvos és Egészségtudományi Centrum
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet
Debrecen, 2008

1. Bevezetés

Az emlőtumor a nők leggyakoribb rosszindulatú daganata, melynek előfordulása az elmúlt 50–80 évben közel tízszeresére növekedett. Hazai viszonyokra vetítve az emlőrákos megbetegedések gyakorisága ma Magyarországon 11%, vagyis minden 9. nőben kialakul emlőtumor. A tradicionális tumorterápiás eljárások mellett a molekuláris alapú kezelések egyre elterjedtebbek, melyek egyik példája az ErbB2 célpontú, trastuzumabbal (Herceptin®) - az ErbB2 elleni, humanizált, monoklonális antitesttel- végzett kezelés. A terápia kifejlesztésének alapjául szolgált, hogy a ductális emlőkarcinómák 20-30%-ban az ErbB2 molekula amplifikációt és fokozott expressziót mutat. Az ErbB2 fokozott expressziója összefügg a daganat magas szövettani grádusával, a ráksejtek magas mitotikus aktivitásával és 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 relapszus-mentes túlélés. A trastuzumab kezelésre monoterápia vagy kombinált terápia során a betegek jelentős része pozitívan reagál, ugyanakkor a terápia során rezisztencia alakul ki a kezeléssel szemben. A rezisztencia oka és pontos mechanizmusa nem ismert.

Munkánk során a trastuzumab rezisztencia mechanizmusát egy új aspektusból kívántuk megközelíteni, vizsgálva az ErbB2 molekula ErbB fehérjecsaldon kívüli molekuláris asszociációinak szerepét a trastuzumab hatásmechanizmusában és a rezisztencia kialakulásában. Irodalmi adatok a CD44 és ErbB2 molekulák közötti kapcsolatra utalnak, melynek jelentősége és funkciója nem ismert, ugyanakkor a molekuláris mechanizmusok értelmezése új terápiás lehetőséget nyithat meg.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család

Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád tagjai nagyszámú ligandjuk révén különböző jelátviteli utakat indítanak el, és szerepet játszanak a szívfejlődésben, a központi és a perifériás idegrendszer fejlődésében, az epitélialis szövetek fejlődésében, a szöveti megújulásban, a sebgyógyulásban, az angiogenezisben. A

receptorcsalád jelentőségét növeli, hogy meghatározó szerepüket azonosították a tumoros sejtek kialakulásában és növekedésében .

Az ErbB tirozin kináz receptorcsaládnak jelenleg négy ismert tagja van, melyek az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR/ErbB1/HER1), az ErbB2 (Her2/Neu), az ErbB3 (HER3) és az ErbB4 (HER4).

2. 2. Az ErbB receptor család jelátviteli modellje

Az ErbB receptorcsalád tagjai által mediált jelátviteli útvonalak jellegét és az arra adott sejtszintű válaszokat jól szemlélteti az úgynevezett „csokornyakkendő” modell. A bemeneti szintet az ErbB receptorok és nagyszámú ligandjuk alkotja, melyeket a receptorokhoz való kapcsolódásuk alapján csoportosíthatunk. A ligandumok a receptorok extracelluláris doménjéhez kötődve stimulálják azok homo-, illetve heterodimerjeinek képződését. A folyamat jelátviteli szintjében a dimerizálódott receptorok tirozin oldalláncai foszforilálódnak, így biztosítva a citoplazmatikus enzimek és az adapter fehérjék kötődését, melyek különböző jelátviteli kaszkádokat stimulálnak. Az ErbB receptorok jelátviteli rendszerét szemléltető csokornyakkendő modellben a kimeneti szintet a sejtszintű válaszok alkotják, melynek révén az ErbB receptorok hatással lehetnek a sejtek proliferációs, migrációs, differenciációs, és apoptotikus folyamataira.

2. 3. Az ErbB receptorok dimerizációjának szerepe a jelátvitelben

A ligand kötődése az ErbB molekulákhoz egy dimerizációs kaszkádot indít el, mely összetett szignálaktivitásokhoz és különböző biológiai válaszokhoz vezet. A képződött dimerek az ErbB jelátvitel esszenciális elemei. A dimerizáción belül az összetétel alapján homo- és heterodimereket, a képződés jelátviteli folyamatban való időzítése alapján pedig primer és szekunder dimereket különítünk el. A dimerizációs viszonyok egyik példája az ErbB1 ligandkötését követő folyamatok, melynek során az ErbB1 EGF kötés után a ligandkötésre képtelen ErbB2-vel egy nagy tirozin kináz aktivitású primer heterodimert képez. A dimer tagjai egymást foszforilálják, intracelluláris szignálutakat indítanak el, majd szétválnak, és az ErbB2 a tirozinkináz hiányos ErbB3-mal szekunder dimert képez. A szekunder dimerben az ErbB2 foszforilálja önmagát és az ErbB3-at, újabb szignálutakat indítva el.

2. 4. ErbB2 szerepe mellrákban

Az ErbB receptorcsaládon belül jelentős szerepet játszik az ErbB2 molekula. Génjének amplifikációját számos daganatban kimutatták ugyanakkor irodalmi adatok azt mutatják, hogy legfontosabb szerepet a mellrákok növekedésének szabályozásában játszik, hiszen ductális emlőkarcinómák 20-30%-ban amplifikációt és fokozott expressziót mutat. Az ErbB2 fokozott expressziója összefügg a daganat magas szövettani grádusával, 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 relapszus mentes túlélés. Az ErbB2-nek nincs saját ligandja ugyanakkor más ErbB molekulák elsődleges dimerizációs partnereként funkcionál.

Mivel az ErbB2 központi szerepet tölt be az ErbB receptorcsalád jelátviteli folyamataiban, felmerült, hogy a receptor gátlása révén kedvező módon befolyásolhatóak lehetnek a malignus folyamatok.

2. 5. Trastuzumab hatásmechanizmusa és a trastuzumab rezisztencia

Az első, szolid tumorok kezelésére kifejlesztett humanizált antitest az ErbB2 elleni trastuzumab, mely az egér eredetű 4D5 jelű antitest variábilis régiójának antigénkötő szekvenciáját tartalmazza. A kedvező klinikai eredmények ellenére a trastuzumab hatásmechanizmusa nem teljesen tisztázott. II-es és III-as klinikai fázisban egyértelműen bebizonyosodott a trastuzumab daganatellenes hatása mind monoterápia formájában, mind kemoterápiával kombinálva.

A kedvező klinikai eredmények ellenére jó néhány 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 vagy szekunder rezisztencia)

2. 6. A CD44 molekula szerkezete és funkciója

A CD44 molekulát (limfocita homing receptor, PGP-1, Hermes antigén, HUTCH-1) elsőként, mint hialuronsav receptort írták le, standard formája egy 80-90 kDa-os transzmembrán glikoprotein. Az I típusú transzmembrán fehérjékhez tartozó receptor szerkezetét tekintve három egységre bontható: extracelluláris domén,

transzmembrán domén és citoplazmatikus domén. A hialuronsav kötődése a CD44-hez aktiválja a receptort és az asszociált molekulákon (pl. Grb2, Vav2, ErbB2) keresztül változatos jelátviteli útvonalakat indít be. Az aktivált kaszkádok közül legjelentősebbek a Rho és a Rac-1, amelyek a citoskeletális elemek aktiválásán keresztül elősegítik a migrációt és a metasztázisképzést.

2. 7. A CD44 kapcsolata az ErbB2 és ErbB1 receptorokkal

A CD44 receptor különböző kinázokkal is kapcsolatban áll. Emlőtumorban a CD44 receptor szerepe *in vivo* nem teljesen tisztázott, ugyanakkor elsődleges ligandjának, a hialuronsavnak akkumulációja egyértelműen a tumor kedvezőtlen prognózisának indikátora. A hialuronsav alapvető szerepet tölt be az ErbB2-ErbB3 heterodimer aktiválásában a szívbillentyűk fejlődése során. A CD44 receptor standard formájának ErbB2 molekulával való asszociációját elsőként petefészekdaganatban írták le. A két receptor extracelluláris doménje diszulfid hidakkal kapcsolódik egymással a ligandkötést megelőzően is. A hialuronsav a CD44-en keresztül fokozza az ErbB2 receptor tirozin kináz aktivitását és fokozta a tumor növekedését. A tumoros sejtek adenovírus 5 E1A génnel (mely gátolja az ErbB2 expressziót) való transzfektálása csökkentette a CD44 expressziót és a CD44 mediálta sejtdhéziót. A hialuronsav nemcsak az ErbB2 aktivitását, hanem más jelátviteli molekulákkal való kapcsolatát is regulálja vastagbél és emlőtumor sejtekben. Az endogén hialuronsav-CD44 komplex kialakulásának megakadályozásával gátolható volt az ErbB2-t, CD44-t, ezrint, PI3K-t, Hsp90-t és cdc37-t tartalmazó, lipid raft asszociált jelátviteli komplex kialakulása is. A fentiek alapján megalapozottnak tűnik az ErbB2-CD44 kölcsönhatás szerepe emlőtumorban, azonban a pontos mechanizmus még nem ismert.

2. 8. A CD44 sheddingjének mechanizmusa és biológiai jelentősége tumorban

Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a membránproteinek funkcionális szabályozásának egyik kulcsfontosságú eleme extra illetve intracelluláris doménjeik proteolitikus hasítása. A CD44 molekula esetén a proteolitikus hasítás valamennyi domént érinti és különböző hatásokat generál. Az ektodomén (ligandkötő rész) oldható formában történő leválásáért és az extracelluláris térbe jutásáért (shedding) többféle proteolitikus mechanizmus felelős. Az ektodomén hasítását membrán-asszociált mátrix metalloproteázok (MMPs) közül elsősorban az MT1-MMP, ADAM10 és ADAM17 metalloproteázok végzik.

A shedding során képződött szolubilis CD44-nek szerepe van a tumorok metasztázisképzésében, illetve a metasztázisképződés és a daganatos progresszió markereként is felhasználható. Patológias körülmények között a hialuronidáz által létrehozott kis molekulású hialuronsav fokozza a CD44 sheddingjét, ezáltal elősegíti a tumorok migrációját, áttétképzését, és ezáltal a daganatos progressziót .

3. Célkitűzések

Munkánk során a CD44 molekula szerepét kívántuk vizsgálni az ErbB2 célzott trastuzumab terápia során kialakuló rezisztenciában. A felvetett kérdéskört az alábbi pontok vizsgálatával kívántuk megválaszolni:

- Megfigyelhető-e az ErbB2 esetén tapasztalható overexpresszióhoz hasonló jelenség CD44 esetén emlőtumorban?
- Van-e valódi funkcionális kapcsolat a CD44 és ErbB2 molekulák között molekuláris szinten?
- Az esetleges CD44-ErbB2 kapcsolatnak lehet-e szerepe a trastuzumab rezisztenciában, ha igen milyen mechanizmus révén?
- A CD44-nek lehet-e szerepe a trastuzumab hatásmechanizmusban alapvetőnek tartott trastuzumab indukálta ErbB2 internalizációban?
- A CD44 esetleges szerepe az általa mediált jelátviteli folyamatok vagy az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolata révén valósul meg?
- Hatással van-e a CD44 a trastuzumab rezisztens JIMT-1 emlőtumor sejtek proliferációjára és a trastuzumab rezisztenciára?
- Milyen mechanizmussal valósul meg a CD44 aktivációja és befolyásolható-e ez a folyamat a CD44-re közvetlenül (hialuronsav oligoszacharid) illetve közvetetten (növekedési faktorok, ErbB elleni antitestek) ható kezelésekkel?
- A metasztázisképzésben alapvető fontosságúnak tartott sejtmotilitásra hatással van-e a CD44 molekula?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Sejtek tenyésztése

In vitro összehasonlító kísérleteinket JIMT-1 trastuzumab-rezisztens emlőtumor, MKN7 trastuzumab-rezisztens gyomortumor, SKBR-3 trastuzumab-szenzitív emlőtumor, sejtvonalakon végeztük. Az SKBR-3, sejtek az American Type Culture Collection (Rockville, MD) gyűjteményéből származnak, és a leírás szerint (10 % FCS-t, 2mM L-glutamint és 0,25% gentamicint tartalmazó DMEM médiumban 5 %-os CO₂ atmoszférában) nőttek korai konfluens állapotig. A JIMT-1 sejtvonal Jorma Isola ajándéka (Laboratory of Cancer Biology, University of Tampere, Finland). Áramlási citometriás mérésekhez a sejteket 0,05 % tripszin - 0,02 % EDTA kezeléssel szuszpendáltuk. Mikroszkópos mérésekhez a sejteket 12 mm átmérőjű fedőlemezre, ill. Lab-TekTM II 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában (Nalge Nunc International, Rochester, NY) növesztettük 80%-os konfluencia eléréséig. A stimulációs kísérletek előtt 24 órán át 0.1 % szérumszármarékú médiumban éhezettük a sejteket.

4. 2. Antitestek és vegyületek

Az ErbB2 sejtfelszíni receptor jelölésére három, nem átfedő extracelluláris epitóp elleni antitestet (trastuzumab, 2C4, 76.5) alkalmaztunk. A trastuzumab (Herceptin, Roche, Budapest) a klinikumban terápiásan alkalmazott antitest, amely az egér 4D5 antitest humanizált változata. A 2C4 jelű monoklonális antitest a Genentech Inc ajándéka volt (South San Francisco, CA). A 76.5 antitestet saját laboratóriumunkban izoláltuk a megfelelő hibridóma sejtvonal (ErbB2-76.5, Y. Yarden, laboratóriumából, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) által termelt felülúszóból. A CD44 receptor valamennyi izoformáját felismerő Hermes-3 antitest kísérleteink első szakaszában Sirpa Jalkanen ajándéka volt (University of Turku, Finland), később hibridóma felülúszóból (HB-9480, American Type Culture collection, Rockville) protein-A affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

4. 3. Sejtfelszíni antigének jelölése antitestekkel.

Az áramlási citometriás vizsgálatokhoz a sejteket tripszines kezelést követően kétszer mostuk hideg PBS-ben (pH = 7,4), majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk

fel 50 µl PBS-ben. A sejteket ezt követően 30 percig, jégen, sötétben jelöltük a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestek vagy azok Fab fragmentumainak telítõ koncentrációjával. Az *in situ* fluoreszcens mikroszkópos mérésekhez a vizsgálandó sejteket 12 mm átmérõjû fedõlemezre ill. Lab-Tek™ II 8-lyukú fedõlemez aljú kamrában (Nalge Nunc International, Rochester, NY) növesztettük 80%-os konfluencia eléréséig.

4. 4. SCID éger modell és xenograft tumor

Az *in vivo* kísérleteinkben használt C.B-17 immundeficiens (Severe Combined ImmunoDeficiency = SCID), patogénmentes környezetben tenyésztett egértörzs a Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, PA) laboratóriumából származott. Hét hetes nõstény SCID egerekbe *subcutan* 5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk 150µl Hanks's pufferben és azonos térfogatú Matrigelben szuszpendálva (Basement Membrane Matrigel, BD Biosciences, Bedford, MA). A tumor növekedését hetenként követtük nyomon, melynek során a tolómérõvel mért hosszúsági, szélességi és magassági adatokból számolt térfogattal kvantitáltuk az eredményeket. A trastuzumab kezelést intraperitoneálisan (i.p.) injektált 5 µg/g-os oldattal végeztük hetenként. A kontrol egereknél párhuzamosan 100 µl fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Bizottságának a nemzetközi normákkal harmonizáló szabályzata alapján végeztük.

4. 5. A sejtek stimulálása hialuronsavval

Kísérleteinkhez két eltérõ számú oligoszaharid egységbõl álló, biológiai aktivitással bíró hialuronsavat (HA) használtunk annak érdekében, hogy az esetleges molekulamérettõl függõ biológiai hatásokat el tudjuk különíteni. Az *in vitro* kísérletek elõtt 24 órán át 0.1 % szérumtartalmú médiumban éhezettük a sejteket. A hialuronsavval történõ stimulálást 37°C-on, 30 percen át végeztük CO₂ inkubátorban 100µg/ml koncentrációjú hialuronsavval.

4.6. A hialuronsav kvantitatív vizsgálata *in vitro* és *in vivo*

A hialuronsav szintjének különbözõ kezelésekre bekövetkezõ mennyiségi változását *in vitro*, Lab-Tek™ II 8-lyukú fedõlemez aljú kamrában, valamint *in vivo* xenograft metszeteken vizsgáltuk. A HA speciális kimutatására kifejlesztett bHABC-t

alkalmaztuk, mely Prof. Markku Tammi ajándéka volt (University of Kuopio, Department of Anatomy, Kuopio, Finland).

4.7 4-metilumbelliferon kezelés

In vivo vizsgálni kívántuk, hogy a megváltozott HA-szint hatással van-e a trastuzumab kezelés hatékonyságára. Ennek érdekében alkalmaztuk a 4-metilumbelliferont (4MU, Sigma, Budapest). Az eredetileg növények által kiválasztott 4-MU a HA-szintetáz specifikus gátlószere. Kísérleteink során a 4-MU-t 1% gumiarábikumban oldottuk fel és orálisan alkalmaztuk 8 óránként 3mg/g mennyiségben (4-MU g/egér-testtömeg). *In vitro* kísérletekben a 4-MU-t PBS-ben oldottuk fel és 1mM-os koncentrációban adtuk a sejt kultúrákhoz.

4.8 A sejtszám és receptorok sejtenkénti számának áramlási citometriás meghatározása

A sejt felszíni receptorok számának kvantitatív meghatározását FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), Qifikit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) alkalmazásával végeztük a gyártó útmutatásainak megfelelően. A sejtszuspenziót 488nm-en, illetve 635-nm-en gerjesztettük, az emissziót 520nm-es és 661nm-es sávszűrő (FL1, FL4) segítségével detektáltuk. A proliferációs assay alkalmazása során a sejtek számát FacsArray áramlási citométer (Becton Dickinson) megfelelő opcióinak alkalmazásával határoztuk meg.

4.9 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A beoltott ráksejtekéből kinőtt *subcutan* tumort érzéstelenítést követően eltávolítottuk, majd Shandon Cryomatrix-szal (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) fedve -20 °C-on tároltuk. A mintákat a megfelelő fluorofórral-konjugált antitestek telítési koncentrációjával (10-20 µg/ml) jelöltük 100µl 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben egy éjszakán át.

4.10. Konfokális mikroszkópia

A mikroszkópos mintákat Zeiss LSM 510 konfokális üzemmódú, lézerpásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany) vizsgáltuk, Plan Apocromat 63x/1.4 NA oil DIC objektív alkalmazásával 1 µm-es optikai szeletben.

Az Alexa-488-at 488 nm gerjesztettük és 505-530 nm-en detektáltuk. Cy3-t és az AlexaFluor546-t zöld He-Ne lézerrel 543nm-en gerjesztettük, és az emissziót 560-615 nm-es sávszűrővel detektáltuk. A Cy5 illetve AlexaFluor647-tel való konjugáció esetén vörös He-Ne lézer 633 nm-es vonalával végeztük a gerjesztést, és az emissziót 650 nm-es felüláteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. A gerjesztő és emittált fotonokat 360/488/543/633 négyszeres dikroikus szűrővel választottuk el. Többes jelölés esetén a csatornák közötti átvilágítás megelőzésére az egyes csatornákat külön külön vettük fel 512×512 pixelméretben.

4. 11 Digitális képanalízis

A konfokális képek elemzését DipImage (Delft University of Technology, Delft, The Netherlands) és Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA) programkörnyezetben végeztük. A sejtfelszíni antigének kolokalizációját a kettősen jelölt sejtek konfokális képeiből határoztuk meg a Pearson-féle keresztkorrelációs koefficiens segítségével.

4. 12 Áramlási citometriás fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérések

Az áramlási citometriás FRET méréseket FACSVantage SE áramlási citométer DiVa opcióval kiegészített (Becton Dickinson) változatával végeztük, amely három lézerrel volt felszerelve, melyek emissziója egyenként 488nm, 532nm, 633nm-en volt. A FRET hatásfokot 1:1 donor-akceptor arányra normalizáltuk és az átlagát 10 000 sejtet megjelenítő hisztogrammon ábráztuk.

4.13 CD44 RNS interferencia

A humán CD44 elleni kis interferáló RNS-t (siRNS) a Dharmacon cég (Chicago, IL) tervezte SMART technológia felhasználásával. Az előkísérletek során a tervezett 4 siRNS-ből a kettő volt hatékony. A JIMT-1 sejtek esetén alkalmazott legmegfelelőbb elektroporációs metodikát, mely a V oldat és a T-20-as program volt, GFP plazmiddal történő transzfektálással határoztuk meg.

4. 14 A trastuzumab internalizációjának vizsgálata

A trastuzumab internalizációjának vizsgálata során az siRNS-sel transzfektált illetve a kontroll sejteket 20 µg/ml AlexaFluor647-trastuzumabbal inkubáltuk

különböző ideig 37°C-on. Az internalizálódott trastuzumabból származó jelet áramlási citométerrel detektáltuk

4. 15 Western blot analízis és immunprecipitáció

A sejtlizátumot a sejtek PBS-sel történő mosását követően lízis puffer felhasználásával készítettük. A vizsgálandó fehérjék molekuláris szintű kapcsolatának elemzéséhez immunprecipitációt alkalmaztunk, melynek során a sejtlizátumot 1 órán át 4 fokon a megfelelő antitestekkel inkubáltuk. Az immunoprecipitált fehérjéket Sepharose 4B Fast Flow Protein G gyöngyök (Sigma) felhasználásával, további 1 órás inkubálással kötöttük meg, majd SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel választottuk szét molekulatömegük alapján és PVDF membránra blottoltuk majd detektáltunk.

4. 16. CD44 in vivo standard ELISA

A kísérleteink során alkalmazott sCD44std instant ELISA kit (Bender MedSystems, Ausztria, Bécs) egy enzimátikus reakción alapuló próba, mely alkalmas az oldható CD44 szintjének kvantitáív meghatározására mind sejt kultúrák felülúszójából, mind szérumból.

4. 17. CD44 internalizáció vizsgálata konfokális mikroszkóppal

A CD44 internalizációjának nyomon követését konfokális mikroszkópiás vizsgálatokkal végeztük. Fedőlemez-aljú kamrába növesztett JIMT-1 sejteket antitestekkel illetve növekedési faktorokkal kezeltünk, majd megfelelő fluoreszcensen jelölt antitesttel jelöltünk. A fluoreszcens képeket 1µm-es optikai szeletekről készítettük 63x nagyítású immerziós objektívvel (NA=1.4).

4. 18. A sejtek migrációjának vizsgálata

A sejtek migrációját *in vitro* Lab-Tek™ II 8-lyukú, fedőlemez aljú kamrában vizsgáltuk karcos próba (*in vitro* scratch assay) alkalmazásával. A próba egyszerű módon teszi lehetővé a sejt migráció mérését. A sejt migrációt Zeiss LSM 510 mikroszkóp transzmissziós csatornájában, 10x objektívvel, 0 és a 24 óránál készített felvételek alapján követtük nyomon. A tárgyasztal pozícióját adott kontroll ponthoz viszonyítva határoztuk meg. A migráció kvantifikálása a kalibrált képek pixelszélessége alapján ImageJ programmal történt.

4.19. Statisztika

Az adatokat átlagát \pm 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 ($P < 0.05$).

5. Eredmények és megbeszélésük

5.1 A CD44 fokozottan expresszálódik trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteken és asszociál az ErbB2-vel

Munkánk során a CD44 potenciális szerepét kívántuk vizsgálni a trastuzumab rezisztenciában. A CD44 hialuronsav receptort elsőként mint limfocita „homing” molekulát írták le, napjainkra viszont nyilvánvalóvá vált, hogy feladata jóval sokrétűbb, többek között szerepet játszik a tumorok progressziójában is. Irodalmi adatok a CD44 és ErbB2 molekulák közötti kapcsolatot támasztják alá. A leírt ErbB2-CD44 kapcsolat alapján felmerül annak lehetősége, hogy a CD44 hialuronsav-kötése révén aktivált folyamatok szerepet játszhatnak a trastuzumab rezisztenciában is. Elsőként a CD44 expresszióját vizsgáltuk, mivel ErbB2 esetén a molekula fokozott kifejeződése szervesen kapcsolódik a tumor kedvezőtlen prognózisához. Áramlási citometriás mérési adataink azt mutatták, hogy a trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejtvonalon közel 35-ször magasabb a sejtfelszíni CD44 molekulák száma ($2,3 \pm 0,3$ millió/sejt), mint a trastuzumab szenzitív SKBR-3 sejteken (65000 ± 5000 /sejt).

A CD44 általunk mért fokozott expressziója nem csupán fent említett ErbB2 és CD44 közötti kapcsolat miatt érdekes, hanem felveti annak lehetőséget, hogy a JIMT-1 sejtvonal közvetlenül a stem/progenitor sejtekből fejlődött ki, mivel az irodalomban a CD44 overexpressziót az emlőtumor őssejtek egyik markereként írták le. A vizsgált molekulákra jelölt konfokális mikroszkóppal készített felvételek analízise során a keresztkorrelációs koefficiens értéke CD44 és ErbB2 között 0,612-nek adódott JIMT-1, és 0,602-nek SKBR-3 sejteken, ami a vizsgált molekulák közötti jelentős kolokalizációra utalt a mikroszkóp ~200nm-es felbontási tartományában.

CD44 és ErbB2 molekulák közötti normalizált mérési eredményeink $16 \pm 3\%$ -os FRET értéket adtak JIMT-1, és $10 \pm 3\%$ -os SKBR-3 sejtek esetén. Ezek az értékek a CD44 és ErbB2 közötti molekuláris szintű asszociációra utalnak. A biofizikai módszerekkel mért eredményeinket másik nézőpontból, klasszikus molekuláris biológiai módszerrel is megvizsgáltuk. Western-blottal végzett kísérleteink azt igazolták, hogy a CD44 elleni antitest ko-immunoprecipitálta az ErbB2 molekulát és a nagy molekulatömegű HA fokozta az ErbB2 tirozin foszforilációját, ugyanakkor nem volt kimutatható ErbB1 foszforiláció.

Összefoglalva CD44 expressziós és CD44-ErbB2 kapcsolatot elemző kísérleteinket elmondható, hogy az áramlási citometriás, konfokális mikroszkópiás és a western blotlalt végzett kísérletek egybehangzóan a CD44-ErbB2 közötti funkcionális kapcsolatot támasztottak alá, mely alapul szolgálhat a CD44-hialuronsav kölcsönhatás trastuzumab rezisztenciában betöltött szerepéhez.

4.2 A CD44 expressziós szintje korrelál a trastuzumab internalizációjával JIMT-1 xenograftokban.

In vitro kísérleteink a CD44 és ErbB2 közötti szoros kapcsolatot mutatták ki mindkét vizsgált sejtvonalon, a CD44 fokozott expressziója viszont csak a trastuzumab rezisztens sejtekben volt megfigyelhető. Ez az eredmény még inkább indokoltá tette az eredeti kérdésfeltevést: a CD44 esetleges szerepének vizsgálatát a trastuzumab rezisztenciában. Vizsgálatainkban 7 hetes nőstény SCID egereket használtunk. A trastuzumab kezelést intraperitoneálisan (i.p.) injektált 5 µg/g-os oldattal végeztük hetenként, a kontroll egereknél 100 µl fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk. A kezelést 9 héten át végeztük, majd mindkét csoportban fiziológiás sóoldattal folytattuk további 6 hétig, majd az egereket CO₂-ban túlaltattuk. A kinőtt xenograftokból 20µm-es gyorsfagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket háromszorosán jelöltünk CD44, ErbB2 és trastuzumab ellenes fluoreszcensen jelölt antitestekkel. A kötődött trastuzumab az ErbB2 és a CD44 receptorok egymáshoz viszonyított arányát két-dimenziós hisztogramon (dot plot) jelenítettük meg, amelynek készítése során csak a membrán-pixelek intenzitását használtuk fel. A konfokális képek elemzése során a CD44 receptor expressziós szintjét külön határoztuk meg a dot plotok alapján magas és alacsony trastuzumab-ErbB2 aránnyal rendelkező pixeleken. A dolgozatban összegzett kísérletekben kialakult xenograftok vizsgálata során azt az érdekes eredmény kaptuk, hogy az ErbB2 expressziója nem mutat szoros korrelációt a kötődött trastuzumab szintjével azokban az egerekben, ahol a trastuzumab kezelést már 6 hete felfüggesztettük. Tehát a trastuzumab kezelés felfüggesztése után hat héttel voltak olyan területek a xenografton, amelyeken a trastuzumab nagyobb mértékű kötődése volt megfigyelhető. A megfigyelt jelenség felveti azt a kérdést, hogy több héttel a trastuzumab kezelés befejezését követően mi okozhatja a trastuzumab egyes xenograft-régiókon megfigyelt jelentős intenzitását. A kérdés értelmezése kapcsán vizsgáltuk a CD44 expressziós szintjét. Eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab/ErbB2 arány negatív korrelációt mutatott a CD44

expressziós szintjével, azaz azokon a területeken, ahol magasabb volt a CD44 expresszió, alacsonyabb ErbB2 expressziót találtunk. Ugyanakkor a kontroll egerekben a CD44 és a trastuzumab/ErbB2 között pozitív korreláció volt megfigyelhető. A trastuzumab kötődésében megfigyelt heterogenitás hátterében a trastuzumab lokális kötődésben illetve internalizációjában való eltérés állhat. A xenograftok elemzésével mindkét lehetőséget megvizsgáltuk. A folytonos trastuzumab kezelést követően szoros összefüggést találtunk az ErbB2 expressziója és a kötődött trastuzumab szintje között, ezen eredmény alapján trastuzumab szintjében tapasztalt heterogenitás hátterében nem állhat a kötődésbeli különbség.

A tapasztalt eltérő trastuzumab intenzitás hátterében álló másik alternatíva a különböző trastuzumab internalizáció volt. A trastuzumab internalizáció fluoreszcencia intenzitáson alapuló kvantifikálására nem volt lehetőségünk az alacsony jel-zaj arány miatt, ezért alternatív lehetőségként a CD44 és ErbB2 expresszió közötti esetleges összefüggést vizsgáltuk. Vizsgálataink során három eltérően kezelt egér xenograftot elemeztük a CD44 és az ErbB2 expressziót: trastuzumab kezelés előtt, trastuzumab kezelés alatt és 6 héttel a trastuzumab kezelés befejezését követően. Összegezve mérési eredményeinket feltételezzük, hogy a JIMT-1 xenograftok CD44 expresszióra nézve heterogének, megkülönböztethetünk CD44-et magasas ($CD44_{magas}$) és alacsonyan ($CD44_{alacsony}$) expresszáló területeket. A $CD44_{magas}$ sejtekben a trastuzumab kötött ErbB2 nagyobb mértékben internalizálódik a trastuzumab kezelés során, ez okozhatja CD44 és ErbB2 közötti negatív korrelációt ezekben a mintákban. A trastuzumab kezelést követően a sejtek képesek újra szintetizálni / recirkulálni az ErbB2-t, ugyanakkor ezekhez a receptorokhoz már nem kötődik trastuzumab, ezért a trastuzumab/ErbB2 arány alacsonyabb, mint a $CD44_{alacsony}$ sejteken. Ezen a mérési eredmények igazolják, hogy az ErbB2 nagyobb mértékben internalizálódik illetve down-regulálódik azokban a sejtekben, ahol a CD44 expressziója magas.

4. 3. A CD44 expressziójának RNS interferenciával való blokkolása gátolja a trastuzumab internalizációját.

A CD44 expresszióknak a trastuzumab internalizációban betöltött szerepét egy másik megközelítésben in vitro, CD44 elleni kis interferáló RNS alkalmazásával is vizsgáltuk. Áramlási citometriával mértük a trastuzumab internalizációját a CD44 siRNS-sel transzfektált JIMT-1 sejteken. Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy

CD44siRNS kezelés hatására a kontrol sejtekhez viszonyítva megközelítőleg 50%-kal csökkent a trastuzumab internalizáció.

A jelenséget többféleképpen értelmezhetjük. Lehetséges, hogy a CD44 expresszió siRNS-sel való gátlása hatással volt az endocitotikus rendszerre és ennek révén fejtette ki a trastuzumab-internelizációt gátló hatását. Ugyanakkor az az alternatíva sem elvethető, hogy a fokozott CD44 expresszió trastuzumab internalizációra illetve ErbB2-re kifejtett stimuláló hatása jelentősen csökkent a CD44 expressziójának gátlásával. Annak a megfigyelésnek, hogy a CD44 szerepet játszhat az ErbB2 internalizációjában és down-regulációjában, terápiás vonatkozása is lehet, hiszen az ErbB2-t célzó radioaktív immunotoxinok vagy kemoterapeutikumok hatásának értelmezésénél a CD44 ErbB2 internalizációt módosító hatását is figyelembe kell venni.

4.4 A 4-metilumbelliferon (4-MU) fokozza a trastuzumab tumornövekedést gátló hatását JIMT-1 xenograftokban

Mivel a tumor xenograftok immunhisztokémiai vizsgálata arra utalt, hogy a CD44 befolyásolja a trastuzumab internalizációját, vizsgálni kívántuk, hogy a CD44-hialuronsav útvonalnak lehet-e hatása a trastuzumab terápiás hatékonyságára *in vivo*. A JIMT-1 sejtekkel beoltott SCID egereket 4-MU-nal (a hialuronsav szintetáz gátlószere), trastuzumabbal, illetve ezek kombinációjával való kezelését közvetlenül a tumorsejtek injektálását követően elkezdtük. A kezelések során közel 60 napig nyomon követtük a xenograftok méretbeli változásait, mérési eredményeink azt mutatják, hogy a 4-MU kezelés trastuzumabbal kombinálva lényegesen hatékonyabban gátolta a tumor növekedését, mint a trastuzumab monoterápia. Ugyanakkor érdekes módon a 4-MU kezelésnek önmagában nem volt tumornövekedést gátló hatása annak ellenére, hogy alkalmazása közel 40%-kal csökkentette a hialuronsav mennyiségét JIMT-1 tumorszövetben.

Irodalmi adatok a sejt-hialuronsav interakciót alapvető fontosságúnak írták le a rákos sejtek túlélésében és metasztázisában. Érdekes módon JIMT-1 sejteknél nem volt kimutatható ez a hatás, mivel a 4-MU alkalmazása önmagában ugyan csökkentette a hialuronsav szintjét a sejtek körül, de a tumor növekedését nem gátolta meg. Ugyanakkor a jelenség hátterében az is állhat, hogy a 4-MU által kifejtett hatás nem volt elegendő a tumor-gátlás kialakulásához, de elegendő lehet a receptor epitópjának szabaddá tételéhez. A trastuzumab kezelt sejteken megfigyelhető emelkedett CD44

szint a molekula csökkent sheddingjének lehet az eredménye, amit a trastuzumab kezelés válthat ki (l. később). A 4-MU kezelés nem csupán a CD44-re és a hialuronsavra volt hatással, hanem down-regulálta az ErbB2-t, hasonlóan a trastuzumabhoz. Ez az eredmény alátámasztja korábbi megfigyeléseinket, amelyek a JIMT-1 sejteken megfigyelhető emelkedett CD44 expressziós szint és a fokozott ErbB2 internalizáció közötti összefüggést írták le. Összegzésként elmondható, hogy a 4-MU nem csupán fokozta a trastuzumab tumor-növekedést gátló hatását, hanem fokozta az ErbB2 trastuzumab mediálta internalizációját is. Kísérleti eredményeink és korábbi irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a 4-MU az ErbB2 trastuzumab-kötő epitópjának szabaddá tétele (unmasking) fejti ki hatását.

4.5 A CD44 alapvető fontosságú a JIMT-1 sejtek proliferációjához *in vitro*

Mivel kimutattuk, hogy a trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejtvonalon a CD44 fokozott mértékben expresszálódik, és fokozza az ErbB2 trastuzumab-mediálta internalizációját, felmerült a kérdés, hogy a CD44 expressziójának gátlása hatással van-e a trastuzumab hatására *in vitro*. Irodalmi adatok már előzőleg bemutatták, hogy a JIMT-1 sejtek rezisztensek a trastuzumab kezelésre *in vitro*. Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a JIMT-1 sejtek proliferációja gátolható volt a CD44 expressziójának siRNS mediálta gátlásával (10. ábra), ugyanakkor a trastuzumab és a CD44siRNS hatása között nem volt kölcsönhatás, mivel a trastuzumab nem fokozta a CD44siRNS hatását. Ezt a CD44siRNS és a trastuzumab közötti antagonizmus is okozhatja, hiszen a CD44siRNS gátolja a trastuzumab internalizációját. Szintén nem teveszthető szem elől az a tény, hogy *in vivo* és *in vitro* a sejtfelszíni CD44-hez kötődő hialuronsav mátrix jelentős eltérést mutat komplexitásában, így az *in vivo* és *in vitro* eredmények nem összevethetőek. Az SKBR-3 sejtek alapvetően szenzitívek a trastuzumab kezelésre és alacsony CD44 expressziós szintjük révén a CD44 expressziójának siRNS-sel való csökkentése nem volt lényeges hatással ezen sejtek proliferációjára (10. ábra).

4.6. A hialuronsav oligoszacharid, az EGF és a heregulin fokozzák a CD44 sheddingjét és internalizációját

Kísérleti eredményeink a CD44 fokozott expresszióját és a trastuzumab indukálta ErbB2 internalizációban betöltött stimuláló szerepét igazolták. A megfigyelt hatásokon túl a CD44 hatásmechanizmusáról is több információt kívántunk kapni. Ezt

a célt szolgálták a CD44 shedding szerepét elemző kísérleteink, melyek azokra az irodalmi adatokra támaszkodtak, hogy a CD44 funkcionális szabályozásának egyik kulcsfontosságú eleme extra- illetve intracelluláris doménjeinek proteolitikus hasítása (sheddingje). Mivel a CD44-ről és az ErbB fehérjéről egyaránt leírták, hogy szerepük alapvető a metasztatikus folyamatokban, meg kívántuk vizsgálni, hogy a két molekula által mediált jelátviteli folyamatok kölcsönhatnak-e CD44 esetén a molekula működése szempontjából meghatározó endocitotikus és hasítási folyamatokban. Kísérleteink során meg kívántuk vizsgálni, hogy a hialuronsav fragment, az EGF (az ErbB1 ligandja) és a heregulin (az ErbB3 ligandja) a hatással van-e a CD44-re az általunk modellként használt trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteken. Eredményeink azt mutatták, hogy mindhárom általunk vizsgált vegyület (hialuronsav, EGF, heregulin) stimulálta a CD44 sheddingjét és endocitózist. Nem csupán növekedési hormonok és hialuronsav, hanem ErbB fehérjék elleni antitestek hatását is vizsgáltuk. Ezen kísérleteink során cetuximab (EGF elleni antitest), pertuzumab (ErbB2 elleni antitest) hatását követtük nyomon. Vizsgálni kívántuk, hogy ezek az ErbB1-t illetve ErbB2-t blokkoló antitestek hatással vannak-e az általunk korábban tapasztalt EGF és heregulin által fokozott CD44 hasításra. Az előző kísérlethez hasonló módon végzett és ELISA-val detektált eredményeink azt mutatták, hogy az ErbB2 elleni antitest (pertuzumab) szignifikánsan gátolta a CD44 EGF és heregulin által fokozott sheddingjét és internalizációját. A cetuximab (ErbB1 elleni antitest) gátolta az EGF hatását, ami azzal értelmezhető, hogy a cetuximab blokkolja az EGF kötődését a receptorához (ErbB1). Ezek az eredmények megerősítették az előző kísérletben a ligandokkal való stimulálást követően tapasztalt hatást. A hialuronsav oligoszacharid által kiváltott CD44 hasítás indukcióját viszont nem mérsékelte a cetuximabbal való kezelés. Azt a megfigyelést, hogy a pertuzumab mind a heregulin, mind az EGF által kiváltott hatást gátolta, összefüggésbe lehet hozni azzal az ismert jelenséggel, hogy az ErbB fehérjék egymással való heterodimerizáció révén fejtik ki hatásukat. Az az eredmény, hogy a pertuzumab nagyobb mértékben gátolta a heregulin indukciós hatását, mint az EGF-ét, jól korrelál azzal az irodalmi adattal, hogy az ErbB2 elsődleges heterodimerizációs partnere az ErbB3, ami viszonylag magas szinten expresszálódik JIMT-1 sejteken, és mivel tirozinkináz aktivitással nem rendelkezik, hatásának kifejlődéséhez obligát módon asszociálnia kell az ErbB2-vel. Összegezve a pertuzumabnak illetve a cetuximabnak nem volt

önmagában hatása a CD44 hasítására, csupán a korábban mért EGF, heregulin és hialuronsav indukcióra voltak hatással eltérő módon.

4.7. Trastuzumab hatása a CD44 sheddingjére *in vitro* és *in vivo*

Kísérleteink igazolták az ErbB2 és CD44 kapcsolatát JIMT-1 sejteken, illetve saját és irodalmi adatok az ErbB fehérjék szerepét a CD44 hasításában, ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy a trastuzumab hatással van-e a CD44 sheddingjére. Mérési eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab egyaránt gátolta a CD44 heregulin és hialuronsav oligoszacharid által indukálta sheddingjét, a CD44 endocitózisát illetve a sejtmembránon belüli hasítását. Mivel a trastuzumab ErbB2 elleni antitest, ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy ErbB2 része lehet a CD44 mediálta jelátviteli komplexnek és befolyással lehet a CD44 hasítására is. A trastuzumab hialuronsav oligoszacharid által kiváltott indukcióra gyakorolt gátlása szintén értelmezhető az ErbB2-re kifejtett gátlásával, amennyiben elfogadjuk az ErbB2 irodalomban leírt aktiváló hatását. *In vitro* eredményeinket *in vivo* is megvizsgáltuk JIMT-xenograftból vett mintákon. Eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab szignifikánsan ($p < 0.05$) csökkentette a vér CD44 koncentrációját. Feltételezhető, hogy a CD44 sheddingjének trastuzumab indukálta gátlása kapcsolatban állhat az antitest metasztázist gátló hatásával. Nagy tumorok esetén vett vérmintáknál is megvizsgáltuk a CD44 koncentrációt, ahol 7-9 hetes kontrol egerekből és 13-14 hetes trastuzumabbal kezelt egerekből vettünk mintát. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy nagy tumorméretnél a trastuzumab nem volt jelentős hatással a CD44 koncentrációjára. A jelenség hátterében állhat az a korábbi megfigyelésünk, hogy 10 hetes kezelést követően trastuzumab rezisztencia alakul ki.

4.8. ErbB-ellenes antitestek hatása az EGF, a hialuronsav oligoszacharid és a heregulin által kiváltott sejtmozgásra

Mivel irodalmi adatok a CD44 sheddinget alapvető fontosságúnak írják le a sejtek motilitásában, meg kívántuk vizsgálni, hogy az általunk tapasztalt hatások, amelyek befolyásolták a CD44 sheddingjét, hatással vannak-e a sejt-motilitásra is. A sejt migráció értékelésére az úgynevezett karcos próbat (in vitro scratch assay) alkalmaztuk, amely módszer egyszerű módon teszi lehetővé a sejt migráció mérését. Eredményeink alapján elmondható, hogy a hialuronsav oligoszacharid, az EGF valamint a heregulin fokozta a sejtek migrációját a kezeletlen mintához viszonyítva

($p < 0.05$, 15. ábra), mely eredmény korrelál korábbi megfigyeléseinkkel. Az antitestekkel végzett kezelések eredményei jól korreláltak a CD44 shedding mértékével, hiszen a pertuzumab gátolta mind az EGF, mind a heregulin motilitásfokozó hatását, a cetuximab csak az EGF hatását blokkolta, a trastuzumab viszont gátolta a hialuronsav és a heregulin hatását is. Az általunk megfigyelt sejtmotilitásra kifejtett hatás azért is figyelemreméltó, mivel a tumoros betegek túlélését alapvetően befolyásolja a metasztázisok képződése, amely a rákos sejtek motilitási képességén alapul. Az ErbB ellenes antitestek ezen hatásának potenciális klinikai vonatkozása további vizsgálatokat igényel.

4.9. A hialuronsav oligoszacharid hatása a trastuzumab internalizációjára

Kísérleti eredményeink az igazolták, hogy az ErbB receptoroknak hatása van a CD44 hasítására és internalizációjára, ezért meg kívántuk vizsgálni, hogy a másik, vagyis a CD44 irányából tapasztalunk-e hatást az ErbB fehérjék működésére, konkrétan a trastuzumab kötött ErbB internalizációjára (röviden trastuzumab internalizáció). Ezt oly módon vizsgáltuk, hogy JIMT-1 sejteket a CD44 elsődleges ligandjával, hialuronsavval kezeltük, majd mértük a trastuzumab internalizációt. Eredményeink az mutatják, hogy a trastuzumab internalizációja szignifikánsan fokozódott ($p < 0.05$) a hialuronsavval kezelt mintákban a kontroll sejtekhez viszonyítva (16. ábra). Ez az eredmény megerősíti azt a feltevésünket, amely feltételezi a CD44 és az ErbB2 molekulák kapcsolatát JIMT-1 sejteken.

4.10. Végső konklúzió

Vizsgálati eredményeink alátámasztják a CD44 szerepét az ErbB2 trastuzumab indukálta internalizációjában és antitest-kötő epitópjának „maszkolásában”. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy az ErbB2, a CD44 és az ErbB1 fehérjék funkcionális egységet alkotnak a sejtmembránban és hatással lehetnek egymás hasítási, endocitotikus és jelátviteli folyamataira. A komplexnek meghatározó szerepe lehet a sejtek motilitásában is. Megfigyeléseink segíthetik az ErbB2 és ErbB1 célzott terápiák tervezését, amelyekben a terápia kiválasztásánál nem csupán a célmolekulák, hanem a CD44 expresszióját is figyelembe kell venni. A szolubilis CD44 vizsgálata során kapott eredményeink felvetik a szolubilis CD44 szint, mint metasztázis prediktor ágens figyelembevételének és alkalmazásának lehetőségét.

6. Összefoglalás és gyakorlati jelentőség

Munkánk során célul tűztük ki a CD44 molekula szerepének vizsgálatát az ErbB2 célzott tumorterápia során kialakuló trastuzumab rezisztenciában. Mérési eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

- Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a CD44 molekula fokozottan expresszálódik JIMT-1 trastuzumab rezisztens emlőtumor sejtek felszínén és asszociál az ErbB2-vel.
- A CD44 fokozott expresszióját és az ErbB2 trastuzumab indukálta internalizációját figyeltük meg JIMT-t xenograftokon SCID egerekkel végzett kísérleteinkben, mely pozitív korrelációt mutatott a sejtek CD44 expressziójával
- A CD44 expresszió RNS interferenciával való gátlása jelentősen csökkentette a trastuzumab internalizációt *in vitro*.
- A általunk alkalmazott 4-metilumbelliferon - mint a hialuronsav-szintetáz gátlószere - alkalmazásával fokozható volt a trastuzumab tumornövekedést gátló hatása SCID egerekben, melyet valószínűleg a hialuronsav szintézis gátlása miatt csökkent ErbB2 maszkolás és a fokozott trastuzumab kötődés okozott.
- A CD44 alapvető szerepét mutattuk ki JIMT-1 sejtek életképességének fenntartásában, ill. proliferációjában, mely a trastuzumab citosztatikus hatását nem fokozta.
- A CD44 shedding vizsgálata során a kísérleti eredményeink az EGF, a heregulin valamint a hialuronsav oligoszacharid CD44 sheddinget indukáló hatását mutatták ki, amely ErbB elleni antitestekkel gátolható volt.
- A tumorok metasztázisképzését meghatározó motilitási vizsgálataink megerősítették a CD44 shedding mérési eredményeinket az alkalmazott ErbB ellenes antitestek motilitást gátló hatásával kapcsolatban.

Kísérleti eredményeink az ErbB2 overexpresszió és a trastuzumab rezisztencia kérdéskörében az ErbB2 és a CD44 eddig nem ismert kapcsolatát mutatták ki. Az ErbB2 trastuzumab kötő epitópjának maszkírozásában a hialuronsav is részt vesz, ezért a hialuronsav szintézis gátlása jelentős mértékben fokozza a trastuzumab

citosztatikus hatását. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az ErbB2-CD44 komplexhez az ErbB1 molekula is kapcsolódik és klasztert alkotva funkcionális egységet alkotnak a sejtmembránban. A klasztert alkotó molekulák hatással vannak egymás hasítására és endocitotikus folyamataira, és együttesen befolyásolhatják a sejtek motilitását. Kísérleteink alapján az oldható CD44 molekula vizsgálata egy a metasztázis kockázatát megjósoló mérési módszer alapját képezheti.

8. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló 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.} **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. *Közlésre elfogadva Cancer Letter* **IF: 3,277**

Egyéb 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.} Fazekas Z, Petrás M, Fábíán A, **Pályi-Krekk Z**, Nagy P, Damjanovich S, Vereb G, Szöllősi J. Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy. *Cytometry A*. 2007 Nov 28; **IF: 3,293**

^{3.} Rákosy 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**

4.

A tézisekben felhasznált közlemények összes impact faktora: 7,444

Egyéb közlemények összes impact faktora: 13,117

Összes impact faktor: 20,561

Absztraktok

1. **Pályi-Krekk Zs.**, Barok M., Tammi M., Isola J., Vereb Gy., Nagy P., Szöllősi J.: The role of CD44 in the malignant phenotype of a trastuzumab resistant breast cancer cell line. *Cytometry Part A* 71A (7): 527-527 Jul. 2007.
2. Janos Szollosi, Zsolt Sebestyén, **Z Krekk**, Peter Nagy, The role of HER-2 oncogene in the metastasis of breast tumors. *Cytometry* 2001 46, 199-200.
3. Sebestyén Zs., **Krekk Zs.**, Nagy P., Vereb Gy., Balogh L., Barok M., Bárdos H., Damjanovich S., Szöllősi J.: Heteroassociations of erbB molecules on breast tumor cell lines. *Cytometry* 2001, 46: 212.

Előadások és poszterek

1. **Zsuzsanna Pályi-Krekk**, Márk Barok, János Szöllősi, Peter Nagy The role of CD44 in the malignant phenotype of a trastuzumab resistant breast cancer cell line International Conference of Molecular Recognition, Pécs, Hungary 2007 (előadás)
2. **Pályi-Krekk Zs**, Barok M, Vereb Gy, Szöllősi J, Nagy P, A hialuronsav hatása a CD44 és az ErbB receptorok asszociációira. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Immunfarmakológiai Szekciójának és a Debreceni Akadémiai Bizottság Kísérletes Farmakológiai Munkabizottságának tudományos ülése, 2006. 12. 12., (előadás)
3. **Zsuzsanna Pályi-Krekk**, Márk Barok, Markku Tammi, János Szöllősi, Peter Nagy The effect of Hialuronan on the association of ErbB and CD44 receptors. Congress of the Society of German Cytology, Leipzig, Germany, 2007 (poszter)
4. **Zsuzsanna Pályi-Krekk**, Márk Barok, Jorma Isola, Markku Tammi, János Szöllősi, Peter Nagy The role of CD44 in the malignant phenotype of a trastuzumab resistant breast cancer cell line. ISAC XXIII International Congress, Quebec City, Canada, 2006. (poszter)
(*Outstanding Poster Award*)

5. **Zsuzsanna Pályi-Krekk**, Márk Barok, János Szöllősi, Peter Nagy The role of CD44 in the malignant phenotype of a trastuzumab resistant breast cancer cell line International Conference of Molecular Recognition, Pécs, Hungary, 2007. (poszter)
6. **Pályi Krekk Zsuzsanna**, Horváth Gábor, Fazekas Zsolt, Sirpa Jalkanen, Vereb György, MarkkuTammi, Szöllősi János Az ErbB és CD44 receptorok sejtfelszíni asszociációjának vizsgálata hialuronsav-kezelt tumoros sejtvonalakon. Magyar Biofizikai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2005. (poszter)
7. **Pályi Krekk Zsuzsanna**, Horváth Gábor, Fazekas Zsolt, Sirpa Jalkanen, Vereb György, MarkkuTammi, Nagy Péter Szöllősi János ErbB és CD44 receptorok sejtfelszíni asszociációjának vizsgálata hialuronsav kezelést követően. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai napok 2005. (poszter)
8. **Zsuzsanna Pályi-Krekk**, Gábor Horváth, Zsolt Fazekas, Sirpa Jalkanen, György Vereb, Markku Tammi, János Szöllősi The effect of Hialuronan on the association of ErbB and CD44 receptors. Hungarian Cell Analysis Conference, Budapest, 2004. (poszter)
9. **Pályi Krekk Zsuzsanna**, Horváth Gábor, Fazekas Zsolt, Sirpa Jalkanen, Vereb György, MarkkuTammi, Szöllősi János ErbB és CD44 receptorok sejtfelszíni eloszlásának változása hialuronsav kezelés hatására. Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2004. (poszter)
10. Zs. Sebestyen, A. Bodnar, P Nagy, **Zs Krekk**, , A. Denis, S. Damjanovich, J Szollosi. Különböző CD45 izoformák és a T sejt receptor komplex asszociációja. Sejtbiológia Konferencia, Debrecen, 2001. (poszter)
11. Zs. Sebestyen, **Zs Krekk**, P. Nagy, H. Bardos, S. Damjanovich, J Szollosi. (2001) Association between erbB2 and erbB4 molecules on tumor cell lines. Conference of Hungarian Biophysics Society, Sümeg 2001. (poszter)
12. Zs. Sebestyen, **Zs Krekk**, P. Nagy, Gy.Vereb, L. Balogh, M. Barok, H. Bardos, S. Damjanovich, J Szollosi. Heteroassociation of erbB molecules on breast tumor cell lines. Hungarian Cell Analysis Conference, Budapest, 2000. (poszter)