
A CD44 SZEREPE TRASTUZUMAB REZISZTENS EMLŐTUMORBAN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

PÁLYI-KREKK ZSUZSANNA



**Témavezetők:
Dr. Nagy Péter
Prof. Dr. Szöllősi János**

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2008**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. AZ EPIDERMÁLIS NÖVEKEDÉSI FAKTOR RECEPTOR (EGFR) CSALÁD.....	6
2.2. AZ ERBB RECEPTOR CSALÁD JELÁTVITELI MODELLJE	7
2.3. AZ ERBB RECEPTOROK DIMERIZÁCIÓJÁNAK SZEREPE A JELÁTVITELBEN	10
2.4. ERBB2 SZEREPE MELLRÁKBAN.....	12
2.5. TRASTUZUMAB HATÁSMECHANIZMUSA ÉS A TRASTUZUMAB REZISZTENCIA	13
2.6. A CD44 MOLEKULA SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓJA.....	16
2.7. A CD44 KAPCSOLATA AZ ERBB2 ÉS ERBB1 RECEPTOROKKAL	17
2.8. A CD44 SHEDDINGJÉNEK MECHANIZMUSA ÉS BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE TUMORBAN.....	19
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	22
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	23
4.1 SEJTEK TENYÉSZTÉSE.....	23
4.2. ANTITESTEK ÉS VEGYÜLETEK.....	24
4.3. SEJTFELSZÍNI ANTIGÉNEK JELÖLÉSE ANTITESTEKKEL	25
4.4. SCID EGÉR MODELL ÉS XENOGRAFT TUMOR	25
4.5. A SEJTEK STIMULÁLÁSA HIALURONSAVVAL.....	26
4.6. A HIALURONSAV KVANTITATÍV VIZSGÁLATA <i>IN VITRO</i> ÉS <i>IN VIVO</i>	27
4.7 4-METILUMBELLIFERON KEZELÉS.....	28
4.8 A SEJTSZÁM ÉS RECEPTOROK SEJTENKÉNTI SZÁMÁNAK ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS MEGHATÁROZÁSA	28
4.9 IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATOK.....	28
4.10. KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA	29
4.11 DIGITÁLIS KÉPANELÍZIS	29
4.12 ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS FLUORESCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER (FRET) MÉRÉSEK.....	31
4.13 CD44 RNS INTERFERENCIA	31
4.14 A TRASTUZUMAB INTERNALIZÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	32
4.15 WESTERN BLOT ANALÍZIS ÉS IMMUNPRECIPITÁCIÓ.....	32
4.16. CD44 <i>IN VIVO</i> STANDARD ELISA	33
4.17. CD44 INTRENALIZÁCIÓ VIZSGÁLATA KONFOKÁLIS MIKROSKÓPPAL.....	34
4.18. A SEJTEK MIGRÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	34
4.19. STATISZTIKA	35
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	36
6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS GYAKORLATI JELENTŐSÉG	62
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	64
8. KÖZLEMÉNYEK	70
9. TÁRGYSZAVAK	73

10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	74
11.	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI.....	75

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADCC: antitest-közvetítette sejtfüggő citotoxikus reakció (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

EGF: epidermális növekedési faktor

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor

ErbB: EGF receptor tirozin kináz család (szárnyas eritroblasztos leukémia virális onkogén homológ)

FCET: áramlási citometriás energiáttranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer)

FRET: fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)

TM: transzmembrán domén

SCID egér: *Severe Combined ImmunoDeficiency*

HA: hialuronsav

bHABC: biotinilált hialuronsav kötő komplex (biotinylated hialuronan binding komplex)

4-MU: 4-metilumbelliferon

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 mutatnak. 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, másik része eleve rezisztens a kezelésre. Ugyanakkor a terápia során még az eredetileg válaszoló betegeknél is 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 (Gassmann, Casagrande és mtsai, 1995; Lee, Simon és mtsai, 1995; Meyer és Birchmeier, 1995; Miettinen, Berger és mtsai, 1995; Sibilio és Wagner, 1995; Riethmacher, Sonnenberg-Riethmacher és mtsai, 1997). A receptorcsalád jelentőségét növeli, hogy meghatározó szerepüket azonosították a tumoros sejtek kialakulásában és növekedésében (Yarden és Sliwkowski, 2001).

Az epidermális növekedési faktort (EGF) Cohen fedezte fel 1962-ben (Cohen, 1962), melynek receptorát elsőként hozták összefüggésbe rákos transzformációval (de Larco és Todaro, 1978). A tirozin kináz aktivitással rendelkező receptor szerepét a tumorbiológiában először *in vitro* azonosították (Downward, Yarden és mtsai, 1984), majd *in vivo* is igazolták (Schechter, Stern és mtsai, 1984). Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád napjainkban ismertebb elnevezése az ErbB onkogén család, amely név ma is őrzi az elsődleges felfedezési helyet: *erb*: avian *erythroblastosis* virus. Az elnevezés azon alapszik, hogy az avian erythroblastosis vírusból származó v-erbB onkogén nem más, mint az EGFR csonkított formája. Ezután találták meg analógját az emberi genomban, mikor 1984-ben karcinogénnel kezelt patkányokban kifejlődött *neuro/glioblastómában* felfedeztek egy onkogént, aminek először a *neu* nevet adták. A *neu* nagyon hasonlított a virális v-erbB-hez, terméke pedig az epidermális növekedési faktor receptorhoz; az onkogén az ErbB2 nevet kapta. Szintén elterjedt a HER: humán epidermális növekedési faktor receptor elnevezés.

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). Szerkezetüket tekintve valamennyi receptorban két fő egységet különíthetünk el, melyek a megközelítőleg 620 aminosavból álló extracelluláris ligand-kötő régió és az enzimaktivitással bíró citoplazmatikus domén. Az extracelluláris domén négy alegységre osztható, melyek közül kettő leucinban, kettő pedig ciszteinben gazdag. Az alegységek egymással váltakozva alakítják ki a ligandkötött receptor dimerizációjáért felelős szekvenciát (Ogiso, Ishitani és mtsai, 2002). A két fő alegységet egy 23 aminosavas, α -helikális transzmembrán domén köti össze, melynek lényeges szerepe van a ligandum kötése utáni információátadásban a juxtamembrán doménon keresztül a tirozinkináz aktivitású intracelluláris domén felé.

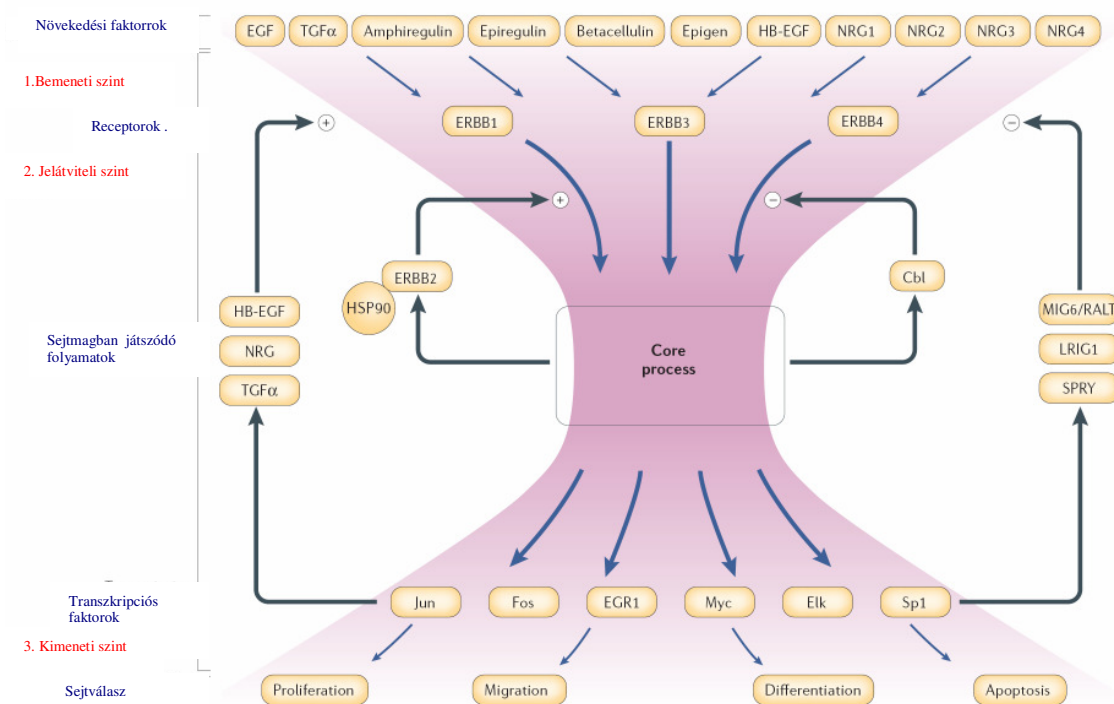
2. 2. Az ErbB receptor család jelátviteli modellje

Az ErbB receptorcsalád tagjai által mediált jelátviteli útvonalak jellegét és az arra adott sejtszintű válaszokat jól szemlélteti az úgynevezett „csokornyakkendő” modell (**1. ábra**) (Citri és Yarden, 2006)

A bemeneti szintet (1. ábra/1) az ErbB receptorok és nagyszámú ligandjuk alkotja, melyeket a receptorokhoz való kapcsolódásuk alapján csoportosíthatunk a következő módon:

1. EGF-szerű ligandok (EGF, transzformáló növekedési faktor α , amfiregulin), amelyek főleg az ErbB1-hez kötődnek.
2. Neuregulinok (NRG 1-4), melyek a neuregulin receptorokhoz (ErbB3, ErbB4) kötődnek.
3. Heparin binding EGF (HB-EGF), betacellulin, epiregulin és az epigen, melyek kötődnek az ErbB1-hez, ErbB3-hoz és az ErbB4-hez is.

Az ErbB2-nek nem ismert fiziológiás ligandja, ugyanakkor a többi ErbB receptor preferált dimerizációs partnere.



1. ábra: Az ErbB receptorcsalád jelátviteli komplexitását és a sejtszintű válaszokat összefoglaló „csokornyakkendő” modell (módosítva Citri és mtsai 2006 alapján)

A ligandumok a receptorok extracelluláris doménjéhez kötődve stimulálják azok homo-, illetve heterodimerjeinek képződését. A folyamat jelátviteli szintjében (1. ábra/2) a dimerizálódott receptorok tirozin oldalláncai foszforilálódnak, így biztosítva a citoplazmatikus enzimek és az adapter fehérjék kötődését, melyek különböző jelátviteli kaszkádokat stimulálnak. Az EGFR esetén az elsődleges adaptor fehérje a Grb2/Sos komplex (Schulze, Deng és mtsai, 2005), amely a proto-onkogén Ras és azon keresztül a Raf-1 fehérjét aktiválja. A Raf-1 sorozatos kináz aktiválás révén (a MAP kináz útvonal) az Erk transzkripciós faktorok nukleáris transzlokációját okozza, ami génátíráshoz vezethet. Emellett a Grb2 a citoszkeleton átrendeződésével is társítható. Az EGFR aktivációt követheti a c-Src

tirozinkinázzal történő kölcsönös foszforiláció, ami proliferációs és transzformációs jelátviteli útvonalakat aktiválhat. Két másik fontos útvonal a foszfolipid metabolizmusban szerepet játszó enzimek közvetlen asszociációt követő aktiválása: a foszfolipáz C- γ (PLC- γ) és a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3-K). Az aktivált PLC- γ , melyet kizárólag az EGFR aktivál az ErbB családon belül, felelős az 1,2-diacil-glicerol (DAG) és az inozitol-1,3,5-triszfoszfát (IP₃) másodlagos hírvivő molekulák képződéséért: az IP₃ az intracelluláris raktárakból szabadítja fel a Ca²⁺-ot, így befolyásolva számos Ca²⁺-dependens enzim működését, míg a DAG a PKC szerin/treonin kináz kofaktora. Az elsősorban az ErbB3 által aktivált PI3-kináz szintén másodlagos hírvivőn keresztül az Akt kináz útvonal (Marmor, Skaria és mtsai, 2004), vagyis túlélési és proliferációs útvonalak aktiválásáért felelős, így feltehetőleg az ErbB fehérjék antiapoptotikus hatásának fő mediátora. Az előbbi folyamatok jól szemléltetik, hogy a jelátviteli szint (1. ábra/2) második szakaszában az aktivált molekulák sejtmagi folyamatokat indítanak el, melyek transzkripció faktorok szintéziséhez vezetnek. Az aktiválódott rendszerek komplexitását növelik a különböző pozitív és negatív visszacsatolási folyamatok (Freeman, 2000). Érdekes módon az ErbB2 receptor is része a pozitív visszacsatolási folyamatnak oly módon, hogy másodlagos receptorként lehetővé teszi, hogy az ErbB2-t tartalmazó heterodimerek elkerüljék a negatív regulációt (Worthylake, Opresko és mtsai, 1999). Másik jelentős pozitív modulátor a receptoraktivációt követően termelődő angiogén faktorok, illetve EGF-szerű növekedési faktorok úgynevezett autokrin/parakrin útvonala. A Ras-MAPK útvonal stimulálása ErbB receptorokon keresztül visszahat a TGF α , a HB-EGF termelődésére (Schulze, Lehmann és mtsai, 2001). Természetesen a negatív visszacsatolásoknak is meghatározó szerepe van a jelátviteli folyamatokban, melyek közül legjelentősebb a defoszforiláció és a lizoszómákban zajló internalizációhoz kapcsolt degradáció (Wiley, 2003). A plazmamembránból történő internalizáció túlnyomórészt kináz független folyamat (Wang, Villeneuve és mtsai, 2005), melyet recirkuláció követhet. Az

ubikvitin-ligáz (Cbl) az internalizálódó receptorhoz kapcsolódva fontos szerepet tölt be receptor degradációban, így negatív visszacsatolás kontrollálásában van jelentősége (Levkowitz, Waterman és mtsai, 1999).

Azonban nem csupán az intracelluláris jelátviteli molekulák, hanem maguk az ErbB molekulák is transzlokálódhatnak sejtmagba. Ennek egyik példája az ErbB4 molekula, melyet az ADAM metalloproteáz család transzmembrán típusú tagjai hasítanak és a második hasítást követően keletkező oldható, 81kDa-os protein transzlokálódik a sejtmagba (Ni, Murphy és mtsai, 2001).

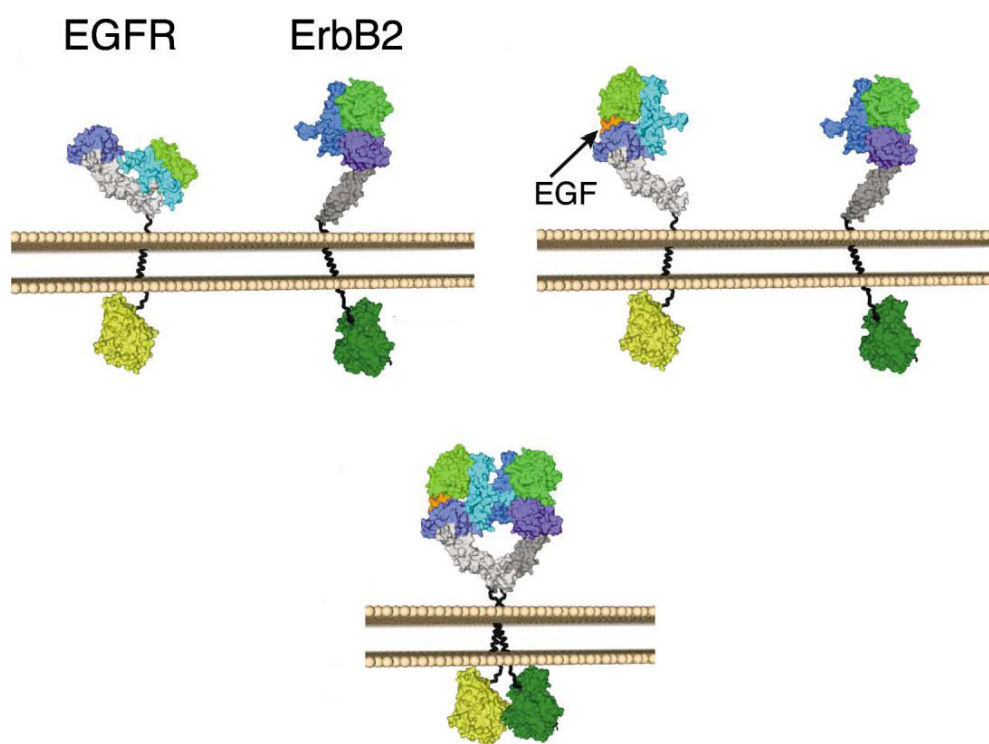
Az ErbB receptorok jelátviteli rendszerét szemléltető csokornyakkendő modellben a kimerítő szintet a (1. ábra/3) a sejtszintű válaszok alkotják, melynek révén az ErbB receptorok hatással lehetnek a sejtek proliferációs, migrációs, differenciációs, és apoptotikus folyamataira.

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 (Citri és Yarden, 2006). A dimerizáción belül az összetétel alapján homo- és heterodimereket, a képződés jelátviteli folyamatban való időzítése alapján pedig primer és szekunder dimereket különítünk el (Gamett, Pearson és mtsai, 1997). 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. Nem teljesen tisztázott, hogy akár a primer, akár a szekunder ErbB2-ErbB3 dimerben az ErbB2 hogyan foszforilálja

önmagát, hiszen szigorúan véve nem „autofoszforiláció”, hanem kereszt foszforiláció játszódik le. A kérdés egyik lehetséges megoldását az ErbB molekulák dimernél nagyobb méretű asszociátumai jelenthetik, melyekben jelen levő ErbB2 proteinek keresztbe tudják egymást foszforilálni. Ilyen nagyméretű asszociátumokara számtalan kísérleti bizonyíték létezik (Nagy, Jenei és mtsai, 1999).

Az ErbB fehérjék dimerizációjának lehetséges szerkezeti mechanizmusa a ligandum indukált konformációs változással magyarázható (2. ábra) (Burgess, Cho és mtsai, 2003).



2. ábra: Az ErbB receptorcsalád dimerizációs mechanizmusának szerkezeti modellje. A bal felső ábrán a „zárt” konformációjú EGFR és a „nyitott” konformációjú ErbB2 látható (a világoszöld és lila részek a ligandum kötő régiók, L1 és L2, a világos- és sötétzöld részek a dimerizációs hurok, CR1, és a szürke rész a CR2 domén), valamint tirozinkináz doménjük (sárga és sötétzöld részek) szerkezete. A jobb felső ábrán az EGF ligandum bekötődése után bekövetkező konformációs változás (zárt → nyitott) látható az EGFR molekulán. Az alsó ábrarész pedig az EGFR-ErbB2 heterodimer kialakulását mutatja; a lehetséges dimerizációs felszínek jól láthatók. Az ábra Franklin és mtsai, *Cancer Cell*, 2004 cikke alapján készült.

Ligandum nélkül az EGFR és az ErbB3 úgynevezett „zárt” konformációban van, azaz a cisztein gazdag CR1 domén kölcsön hat a CR2 domén egy részével. A ligandum kapcsolt, „nyitott” állapotban a CR1 domén kiáll a molekulából, és kristályszerkezet alapján ez felelős az EGFR dimer kialakulásáért, amit eddig csak ligandummal kötött molekulánál tapasztaltak. Ezzel szemben az ErbB2 extracelluláris doménje a feltételezések szerint mindig „nyitott” állapotban található, még monomer formában is, ami megmagyarázhatja, hogy miért ez a molekula a család másik három tagjának a kedvelt dimerizációs partnere.

2. 4. ErBb2 szerepe mellrákban

Az ErbB receptorcsaládon belül jelentős szerepet játszik az ErbB2 molekula. Génjének amplifikációját számos daganatban kimutatták (Salomon, Brandt és mtsai, 1995), ugyanakkor irodalmi adatok azt mutatják, hogy legfontosabb szerepet a mellrákok növekedésének szabályozásában játszik, hiszen ductális emlőkarcinómák 20-30%-ban amplifikációt és fokozott expressziót mutat (Slamon, Godolphin és mtsai, 1989). 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 (Slamon, Clark és mtsai, 1987; Slamon, Godolphin és mtsai, 1989; Menard, Casalini és mtsai, 1999; Paik és Liu, 2000). Az ErbB2-nek nincs saját ligandja (Klapper, Glathe és mtsai, 1999) ugyanakkor más ErbB molekulák elsődleges dimerizációs partnereként funkcionál (Tzahar, Waterman és mtsai, 1996).

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. Az ErbB2 gátlása az alábbi módokon lehetséges:

1. Az ErbB2 tirozin kináz aktivitásának gátlása kináz inhibitorokkal (Fry, Bridges és mtsai, 1998).
2. Az ErbB2 fehérje termelésének gátlása anti-sense oligonukleotidokkal (Bertram, Killian és mtsai, 1994) vagy siRNS-sel (Song, Zhu és mtsai, 2005).
3. Az ErbB2 mRNS-ének hasítása ribozimmal (Tang, Concepcion és mtsai, 1999).
4. Az ErbB2 endoplazmatikus retikulumból a plazmamembránba történő transzportjának gátlása egyláncú ErbB2 ellenes antitesttel (Beerli et al, J. Biol Chem, 1994).
5. ErbB2-ellenes antitestekkel (lásd alább).
6. Toxinok kapcsolása ErbB2 ellenes antitestekhez (immunotoxin) (Batra, Kasprzyk és mtsai, 1992).
7. Immunizálás ErbB2 peptidekkel (Disis és Cheever, 1997).
8. Az ErbB2 degradáció elősegítése geldanamycinnel (Austin et al, Mol Biol Cell, 2004)

Az ErbB2 receptor jelentőséget tovább árnyalja, hogy nem csupán az ErbB receptorcsalád tagjaival, hanem más molekulákkal is alkothat funkcionális egységet. A β 1-integrin (Mocanu, Fazekas és mtsai, 2005), a MUC-4 molekula (Nagy, Friedlander és mtsai, 2005), valamint a CD44 receptor (Bourguignon, Zhu és mtsai, 1997) azok a molekulák, amelyek kapcsolata az ErbB2 receptorral dokumentált, ugyanakkor ezek a molekulák egyedileg is szerepet játszanak a tumorok progressziójában (Bourguignon, 2001) (Carraway, Ramsauer és mtsai, 2005).

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. Az USA Food and Drug Administration (FDA) által 1998-ban

engedélyezett trastuzumabot (kereskedelmi nevén: Herceptin[®]) ma a következő kritériumokat teljesítő esetekben használják (USA):

- kombinálva paclitaxellel olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg még nem kezeltek kemoterápiás szerrel.
- monoterápia formájában, olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg már legalább 2 kemoterápiás szerrel kezeltek.
- 2006 novemberében, miután széleskörű klinikai vizsgálat sorozat megmutatta, hogy 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 (Lin és Rugo, 2007).

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 (Baselga, 2001; Slamon, Leyland-Jones és mtsai, 2001). Irodalmi adatok alapján a lehetséges hatásmechanizmusok a következők. *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 (Cuello, Ettenberg és mtsai, 2001),
- gátolja a mitogén aktiválta protein kináz és a foszfatidil-inozitol-3 kináz szignalizációs útvonalakat (Nagy, Jenei és mtsai, 1999; Sliwkowski, Lofgren és mtsai, 1999),
- csökkenti ciklin D1 expresszióját, ezáltal csökken a ciklin-dependens kináz inhibitor p27^{kip1} szint: a sejtciklus leáll a G1 fázisban (Lane, Motoyama és mtsai, 2001),
- apoptózist vált ki (Cuello, Ettenberg és mtsai, 2001),

- növeli az ErbB2 HLA-I-hez kapcsolódó antigénprezentációjának mértékét (Kono, Sato és mtsai, 2004).
- csökkenti az ErbB2 proteolízisét, amely konstitutívan aktív ErbB2 fragmentum képződéséhez vezet (Molina, Codony-Servat és mtsai, 2001)
- A trastuzumab hatékonyságában jelentős szerepet játszik az ADCC (Barok, Isola és mtsai, 2007)

In vivo trastuzumab-kezelés emlőrák-xenograftokban csökkentette a kis erek számát és átmérőjét, aminek háttérében négy 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 (Izumi, Xu és mtsai, 2002). Szintén *in vivo* mutatták ki, hogy a trastuzumab hatékonyságában jelentős szerepet játszik az ADCC (Barok, Isola és mtsai, 2007).

A kedvező klinikai eredmények ellenére 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 vagy szekunder rezisztencia) (Slamon, Leyland-Jones és mtsai, 2001; Esteva, Valero és mtsai, 2002).

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 (Motoyama, Hynes és mtsai, 2002).
 - Az inzulin-szerű növekedési faktor (IGF) receptor útvonalának aktiválódása (Lu, Zi és mtsai, 2004).

- Akt útvonal aktiválódása (Yakes, Chinratanalab és mtsai, 2002).
 - A MUC4 nevű sejtfelszíni szialomucin (Price-Schiavi, Jepson és mtsai, 2002; Nagy, Friedlander és mtsai, 2005).
 - A PTEN tumorszuppresszor csökkent expressziója (Nagata, Lan és mtsai, 2004).
2. Elégtelen trastuzumab által kiváltott ADCC reakció (Kono, Takahashi és mtsai, 2002).

Az ErbB2 ellenes antitest-terápiával kapcsolatos kutatások során kifejlesztett antitestek közül a pertuzumab (Omnitarg) jelenleg klinikai vizsgálatok alatt áll (Reid, Vidal és mtsai, 2007). Ugyanakkor az ErbB receptorcsalád más tagjai ellen termeltetett antitesteket is vizsgálják, melyek közül több klinikai kipróbálás vagy már alkalmazás alatt áll. A tumorterápiában hatékonyan alkalmazzák a cetuximab (Erbbitux) nevű, ErbB1 receptor elleni antitestet, mely kompetitíven gátolja az EGF kötődését a receptorához (Mendelsohn és Baselga, 2006).

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. Az extracelluláris domén amino terminális szakasza globuláris szerkezetű, melyet három diszulfid-híd stabilizál. Jellegzetessége még, hogy nagyfokú homológiát mutat a porc-kötő fehérjével és eme tulajdonsága alapján kötő (link) doménnek is nevezik (Nagano és Saya, 2004). Az extracelluláris doménon található a hialuronsav-kötő régió, amelyben négy aminosavról (Arg-41, Arg-78, Tyr-42 és Tyr-79) mutatták ki, hogy a hialuronsav kötéshez esszenciálisak (Bajorath, Greenfield és mtsai, 1998). Az extracelluláris domén membránhoz közeli régiójában található az úgynevezett variábilis régió, amelynek

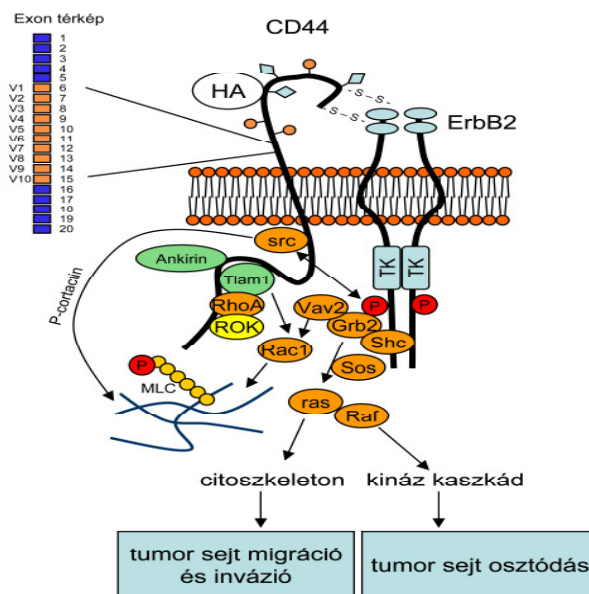
alternatív átírásával a CD44-nek nagyszámú izoformája alakulhat ki, amelyek révén rendkívül összetett fiziológiai funkciókat láthat el (Naor, Sionov és mtsai, 1997). Az izoformák expressziója adott tumoron belül is változhat a tumorprogresszió különböző fázisaiban (Auvinen, Tammi és mtsai, 2005)

A hialuronsav kötődése a CD44-hez aktiválja a receptort és az asszociált molekulákon (pl. Grb2, Vav2, ErbB2) keresztül változatos jelátviteli útvonalakat indít be (Bourguignon, Zhu és mtsai, 2001). Az aktivált kaszkádok közül legjelentősebbek a Rho és a Rac-1, amelyek a citoskeletális elemek aktiválásán keresztül elősegítik a migrációt és a metasztázisképzést (Bourguignon, Zhu és mtsai, 2000). Szintén jelentős az endogén hialuronsav kötődése által aktivált foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K)-Akt útvonal, mely exogén hialuronsav oligoszacharid alkalmazásával gátolható (Ghatak, Misra és mtsai, 2002). A CD44 receptor szerepet játszik a citoskeleton átrendeződésében az ERM proteinekkal (Marhaba és Zoller, 2004), a neurális Wiskott-Aldrich szindróma fehérjével (N-WASP) való kapcsolata révén (Bourguignon, Peyrollier és mtsai, 2007). A CD44 szerepét irodalmi adatok támasztják alá a multidrog rezisztencia kialakulásában, mivel közvetve serkenti a P-glikoprotein (Pgp) szintézisét (Misra, Ghatak és mtsai, 2005), ezáltal segíti az alkalmazott gyógyszerek kiürülését a sejtből (Gottesman, Fojo és mtsai, 2002).

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

A CD44 receptor különböző kinázokkal is kapcsolatban áll (Misra, Toole és mtsai, 2006). Petefészekdaganat sejteken a hialuronsav kötődése aktiválja a receptort és stimulálja a c-Src kináz aktivitást, mely fokozza a P-cortactin tirozin foszforilációját (Bourguignon, Zhu és mtsai, 2001). Emlőtumorban a CD44 receptor szerepe *in vivo* nem teljesen tisztázott, ugyanakkor elsődleges ligandjának, a hialuronsavnak akkumulációja egyértelműen a tumor kedvezőtlen prognózisának indikátora (Auvinen, Tammi és mtsai, 2000). A hialuronsav CD44-hez való kapcsolódásának gátlása szolubilis CD44-gyel vagy hialuronsav oligomerrel

kísérleti állatokban gátolta a tumor növekedését (Peterson, Yu és mtsai, 2000). A hialuronsav alapvető szerepet tölt be az ErbB2-ErbB3 heterodimer aktiválásában a szívbillentyűk fejlődése során (Camenisch, Schroeder és mtsai, 2002). A CD44 receptor standard formájának ErbB2 molekulával való asszociációját elsőként petefészekdaganatban írták le (Bourguignon, Zhu és mtsai, 1997). A két receptor extracelluláris doménje diszulfid hidakkal kapcsolódik egymással a ligandkötést megelőzően is (3. ábra).



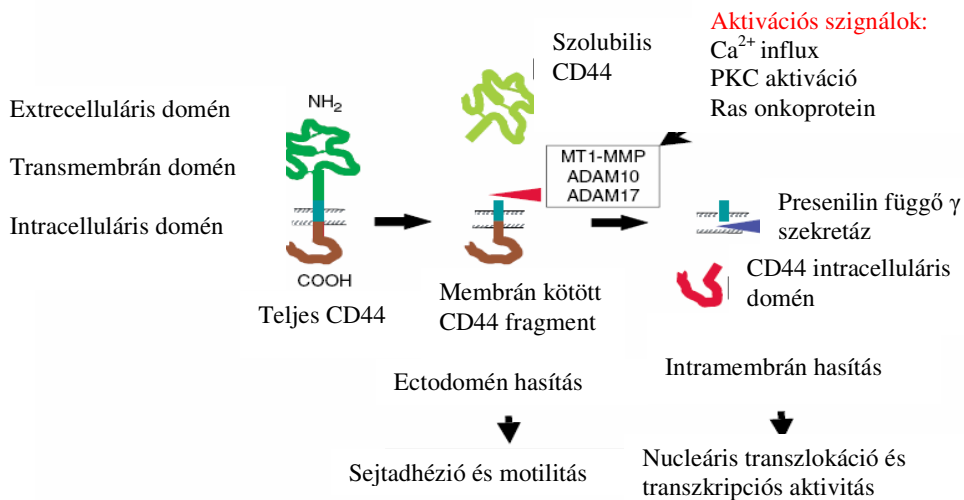
3. ábra A CD44 és ErbB2 receptorok kapcsolata (módosítva Bourguignon 2001 cikke alapján)

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 sejtadhéziót. 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 (Ghatak, Misra és mtsai, 2005). A fentiek alapján megalapozottnak tűnik az ErbB2-CD44 kölcsönhatás szerepe emlőtumorban, azonban a pontos mechanizmus még nem ismert. Irodalmi adatok alapján kapcsolat áll fenn a CD44 és ErbB1 receptorok között fej és nyak tumorban (Wang és Bourguignon, 2006). Az EGF motilitásra kifejtett hatása CD44 dependens, míg mitogén aktivitása független a CD44-től (Ellis, Schor és mtsai, 2007). A disintegrin ADAM10 metalloproteáz CD44 hasítását követően az EGF által szabályozott Rac GTP-áz aktivitás fokozódott (Murai, Miyauchi és mtsai, 2006), ami a CD44 és EGF közötti kapcsolatot támasztja alá.

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 (Nagano és Saya, 2004).



3. ábra A CD44 szekvenciális hasításának modellje és a keletkezett fragmentumok szerepe (módosítva Nagano 2004 cikke alapján)

A CD44 molekula esetén a proteolitikus hasítás valamennyi domént érinti és különböző hatásokat generál (**4. ábra**).

Az ektodomén (ligandkötő rész) oldható formában történő leválásáért és az extracelluláris térbe jutásáért (shedding) többféle proteolitikus mechanizmus felelős (Okamoto, Kawano és mtsai, 1999). Az ektodomén hasítását membrán-asszociált mátrix metalloproteázok (MMPs) közül elsősorban az MT1-MMP, ADAM10 (Okamoto, Kawano és mtsai, 1999) és ADAM17 metalloproteázok végzik (Nakamura, Suenaga és mtsai, 2004)

A hasítási folyamatot többféle mechanizmus stimulálhatja, például az extracelluláris Ca^{2+} influx, a protein kináz C (PKC), illetve a Rho fehérjék aktivációja (Okamoto et al 1999, (Kawano, Okamoto és mtsai, 2000). A shedding során képződött szolubilis CD44-nek szerepe van a tumorok metasztázisképzésében, illetve a metasztázisképződés és a daganatos progresszió markereként is felhasználható (Guo, Liu és mtsai, 1994; Okamoto, Tsuiki és mtsai, 2002). Egy agresszív melanóma sejtvonalban a szolubilis CD44 magas szintjét mutatták ki, mely az invazív fenotípus markere lehet (Goebeler, Kaufmann és mtsai, 1996). A szolubilis CD44 szintje korrelációt mutatott a rezisztenciával kemoterápia során (Kopp, Classen és mtsai, 2001) és kedvezőtlen prognózissal társult (Ristamaki, Joensuu és mtsai, 1997). Patológias körülmények között a hialuronidáz által létrehozott kis molekulású hialuronsav fokozza a CD44 sheddingjét, így elősegíti a tumorok migrációját, áttétképzését, és ezáltal a daganatos progressziót (Sugahara, Hirata és mtsai, 2006). A szolubilis CD44-nek nem csupán más molekulákra van hatása, hanem a hasítás után maradt membránkötött C-terminális rész potenciális antagonistája is (Thomas, Etoh és mtsai, 1993). A membránkötött C-terminális részből intramembrán proteolízis révén presenilin (PS)-függő γ -szekretáz enzim felszabadítja a CD44 intracelluláris doménjét (ICD), amely eljut a sejtmagba és ott transzkripció kofaktorként különböző gének átírását szabályozza (Thorne, Legg és mtsai, 2004). Érdekes módon a presenilin-függő γ -szekretáz enzim szubtrátjai között az E-kadherin,

Irodalmi áttekintés

és a β -amiloid prekursor molekula mellett az ErbB4 fehérje is szerepel (Lee, Jung és mtsai, 2002). Ugyanakkor a metalloproteázok által indukált ErbB2 sheddinget a trastuzumab gátolta (Molina, Codony-Servat és mtsai, 2001).

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). A sejtvonal jelentőségét az adja, hogy ez az eddig ismert egyetlen trastuzumab rezisztens emlőtumor sejtvonal, melyet egy 62 éves trastuzumabra nem reagáló nőbeteg pleurális áttétjéből izoláltak. A JIMT-1 sejtvonal ösztrogén- és progeszteron receptor deficiens, ugyanakkor immunhisztokémiai pozitivitást mutat citokeratin 5/14 és 8/48-ra. A sejtek amplifikált ErbB2 onkogénnel rendelkeznek, amely azonosítható mutációt nem tartalmaz, ugyanakkor az ErbB2 fokozott sejfelszíni kifejeződését eredményezi. A kismolekulájú tirozinkináz inhibitorok (CII033, ZD1839) gátolják a JIMT-1 sejtek proliferációját (Tanner és mtsai. 2004). A sejtvonal fenntartásához 1:1 arányú DMEM és Ham-féle F-12 médium elegyet alkalmaztunk, mely 10% FCS-t, 60 egység/L inzulint és antibiotikumot tartalmazott. Áramlási citometriás mérésekhez a sejteket 0,05 % tripszin - 0,02 % EDTA kezeléssel szuszpendáltuk. Megállapítottuk, hogy a tripszin kezelés nem okoz jelentős változást a vizsgált antigének számában, ugyanakkor kevesebb olyan összetapadt sejttasszociátumot eredményez, mely az áramlási citometriás mérési artefaktumot okozhatja. 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 % szérumtartalmú 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 sejtvonaltól (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 Jalkenen ajándéka volt (University of Turku, Finland), később hibridóma felülúszóból (HB-9480, American Type Culture collection, Rockville) protein-A affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A kontroll mérésekhez használt antitestet, a W6/32-t (az MHC I nehéz lánc ellen) Francis Brodskytól kaptuk. A Cy3 és Cy5 szulfocianid alapú festékekkel (monofunkcionális szukcinimidil-észter) konjugált kecske anti humán IgG (H+L) Fab-t a Jackson ImmunoResearch Europe-tól vásároltuk (Cambridgeshire, UK) A felhasznált antitestek 1 mg/ml koncentrációjú oldatait AlexaFluor488 (Molecular Probes, Eugene, OR), illetve Cy3 és Cy5 (Amersham, Braunschweig, Germany) fluoreszkáló festékek szukcinimidészter származékaival jelöltük a használati utasításnak megfelelően. Az antitesthez nem kötődött festéket gél-szűréssel távolítottuk el Sephadex G-25 oszloppal. A festék-fehérje jelölési arányt (L) spektrofotométerrel határoztuk meg, melynek értéke 1-3 körül volt. A továbbiakban külön nem jelölt vegyszerek a Sigma (Budapest) cégtől származtak.

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 telítő koncentrációjával. A FRET mérésekben használt kettős jelölés esetén a fluoreszcensen jelölt antitest fragmentumokat egyszerre adtuk a sejtekhez. Az alkalmazott antitest koncentráció elősegítette a monovalens kötődést, ami a jégen történő jelöléssel együtt csökkentette a az internalizáció szintjét. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk kétszer és 1 %-os hideg formaldehid-PBS-ben fixáltuk. Az élő illetve a formaldehiddel fixált sejteken kapott eredmények között a mérési hibán belül nem volt eltérés.

Az *in situ* fluoreszcen mikroszkópos mérésekhez a vizsgálandó 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 sejteket a tárgylemez ill. a kamra felszínén jelöltük meg kétszeri PBS-ben történő mosást követően. Az antitesteket 20µg/ml koncentrációban alkalmaztuk, a jelölést 40 percig, jégen végeztük. A jelölést követően sejteket hideg PBS-ben mostuk kétszer és 1 %-os hideg formaldehid-PBS-ben fixáltuk.

4. 4. SCID egér modell és xenograft tumor

Az *in vivo* kísérleteinkben használt C.B-17 immundeficiens (Severe Combined ImmunoDeficiency = SCID), patogénmentes környezetben tenyésztett egértözs a Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, PA) laboratóriumából származott. A SCID egerekben egy, a 16-os kromoszómán lévő gén autoszómális recesszív mutációja (*scid* mutáció) miatt működésképtelen az imunglobulin gének és a T sejt-receptor gének átrendeződéséért felelős

rekombináz. A *scid* mutációra homozigóta egerekben nem található sem T, sem B sejtés immunitás (Bosma és Carroll, 1991). Kísérleteinkben fiatal (7-12 hetes), non-leaky SCID egereket használtunk, melyekben 10-14 hónapos korukra a hordozott mutáció ellenére, csaknem minden esetben kialakul valamilyen fokú B és T sejtés immunitás. A fiatal *scid/scid* egereknél is előfordul olyan egyed, amelyiknek magasabb az IgM szintje (leaky egér), ezért a kísérletek megkezdése előtt megmértük az egerek IgM titerét (Mouse IgM RID KIT, Serotec). A kísérletekhez csak 100ng/ml-nél kisebb IgM vérkoncentrációjú egereket használtunk. Hét hetes nőstény SCID egerekbe *subcutan* 5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk 150 μ l Hanks's pufferben és azonos térfogatú Matrigelben szuszpendálva (Basement Membrane Matrigel, BD Biosciences, Bedford, MA). A tumor növekedését hetenként követtük nyomon, melynek során a tolómérővel mért hosszúsági, szélességi és magassági adatokból számolt térfogattal kvantitáltuk az eredményeket. A trastuzumab kezelést intraperitoneálisan (i.p.) injektált 5 μ g/g-os oldattal végeztük hetenként. A kontroll egereknél párhuzamosan 100 μ l fiziológias sóoldatot alkalmaztunk. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Bizottságának a nemzetközi normákkal harmonizáló szabályzata alapján végeztük.

4. 5. A sejtek stimulálása hialuronsavval

Kísérleteinkhez két eltérő számú oligoszaharid egységből álló, biológiai aktivitással bíró hialuronsavat (HA) használtunk annak érdekében, hogy az esetleges molekulamérettől függő biológiai hatásokat el tudjuk különíteni. A 10 oligoszaharid egységnyi, 2000 Da molekulásúlyú hialuronsav a hanyományos klasszifikáció szerint a kis molekulásúlyú hialuronsavakhoz tartozik, mely a Seikagaku Corporation (Tokió, Japán) ajándéka volt. Alkalmazását az indokolta, hogy irodalmi adatok alapján már van biológiai aktivitása. Az általunk alkalmazott másik, 5000 oligoszaharid egységnyi, 1×10^6 Da molekulásúlyú HA (Genzyme, Cambridge, MA) a nagy molekulásulyi csoportba sorolható, és méreténél fogva

jelentősebb hatása lehet az extracelluláris matrixhoz kapcsolódó folyamatokban. Az *in vitro* kísérletek előtt 24 órán át 0.1 % szérumtartalmú médiumban éhezettük a sejteket. A hialuronsavval történő 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 különböző kezelésekre bekövetkező mennyiségi változását *in vitro*, Lab-TekTM II 8-lyukú fedőlemez aljú kamrában, valamint *in vivo* xenograft metszeteken vizsgáltuk. A mintákat mindkét esetben azonos metodikával jelöltük. A sejteket PBS-sel történő mosást követően 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk 20 percen át szobahőmérsékleten, majd 5 alkalommal 2 percen át mostuk PBS-sel. Az apecifikus jelölést megelőzően a mintákat 1% BSA-PBS-ben mostuk 10 percig. Ezt követően alkalmaztuk a HA speciális kimutatására kifejlesztett bHABC-t (Tammi és mtsai, 1988), mely Prof. Markku Tammi ajándéka volt (University of Kuopio, Department of Anatomy, Kuopio, Finland). A bHABC egy biotinilált porc proteoglikán fragment, amely specifikusan kötődik a HA molekula decaszacharidnyi szakaszához. A reakció első lépéseként a komplexet kötjük a HA-hoz egy éjszakán át, 4°C-on, 5 µg/ml koncentrációban inkubálva. A következő lépésben a biotint detektáljuk FITC-extravidinnel. Negatív kontrollként HA oligo-val előzetesen inkubált bHABC-t adtunk a mintáinkhoz, ill. *Streptomyces*-ből származó hialuronidáz (Sigma, Budapest) kezelést alkalmaztunk. A nem specifikus, az endogén HA esetleges jelölődéséből származó háttérrel endogén biotin blokkoló kit (Molecular Probes) alkalmazásával küszöböltük ki.

4.7 4-metilumbelliferon kezelés

In vivo vizsgálni kívántuk, hogy a megváltozott HA-szint hatással van-e a trasztuzumab 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 3 mg/g mennyiségben (4-MU/egértesttömeg) (Yoshihara és mtsai 2005). *In vitro* kísérletekben a 4-MU-t PBS-ben oldottuk fel és 1 mM-os koncentrációban adtuk a sejt kultúrákhoz.

4.8 A sejtszám és receptorok sejtenkénti számának áramlási citometriás meghatározása

A sejtfelszíni receptorok számának kvantitatív meghatározását FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), Qifikit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) alkalmazásával végeztük a gyártó útmutatásainak megfelelően. A sejtszuspenziót 488 nm-en, illetve 635 nm-en gerjesztettük, az emissziót 520 nm-es és 661 nm-es sávszűrő (FL1, FL4) segítségével detektáltuk. Mintánként 10 000 sejtet analizáltunk, a fluoreszcens jeleket logaritmusos erősítésben vettük fel. Az egyes minták fluoreszcencia hisztogramjának középértékét a megfelelő háttér hisztogramjának középértékével korrigáltuk. A proliferációs assay alkalmazása során a sejtek számát FACSArray áramlási citométer (Becton Dickinson) megfelelő opcióinak alkalmazásával határoztuk meg.

4.9 Immunhisztokémiai vizsgálatok

A beoltott ráksejtekből kinőtt *subcutan* tumort érzéstelenítést követően eltávolítottuk, majd Shandon Cryomatrix-szal (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) fedve -20 °C-on tároltuk. A tumormintákból 20µm-es gyorsfagyasztott metszeteket készítettünk SHANDON AS-620E Cryotome-mal (Thermo Electron Corporation) 25 °C-on.

A metszeteket szilanizált (3-aminopropyl-triethoxysilane, A-3648, Sigma-Aldrich) tárgylemezre helyezve 4%-os formaldehiddel fixáltunk 30 percen át. A fixált mintákat elsőként PBS-ben mostuk 15 percig, majd 1% BSA tartalmú PBS-sel (pH 7.4) ismét 20 percig szobahőmérsékleten. A mintákat a megfelelő fluorofórral-konjugált antitestek telítési koncentrációjával (10-20 µg/ml) jelöltük 100µl 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben egy éjszakán át. A jelölést követően a mintákat kétszer mostuk BSA-PBS-sel, a fluoreszcencia kioltást megelőzendő a mintákat 15 µl Mowiol-lal (Merck, Budapest, Hungary) fedtük, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

4. 10. Konfokális mikroszkópia

A mikroszkópos mintákat Zeiss LSM 510 konfokális üzemmódú, lézer-pásztázó 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 543 nm-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 sejtmembrán azonosítására az ún. manually-seeded watershed algoritmust használtuk (Gonzalez

és mtsai 2004), melyet Dr. Nagy Péter a Dipimage/Matlab interaktív eszköztárának felhasználásával alkalmazott a saját mintáinkra. A fluoreszcencia intenzitást a sejtmembránnak megfelelő területen pixelenként határoztuk meg. A CD44 expresszióinak a trastuzumab ErbB2 receptorhoz való kötődésére kifejtett hatását xenograft metszeteken vizsgáltuk. A metszeteken a felvetett probléma elemzése érdekében hármás jelölést alkalmaztunk a következőképpen: az ErbB2 receptort AlexaFluor488-ErbB2-76.5 antitesttel, a kötődött trastuzumabot Cy3-anti-human IgG-vel, a CD44-et pedig AlexaFluor647-Hermes-3 antitesttel jelöltük meg. A kötődött trastuzumab és az ErbB2 receptor egymáshoz viszonyított arányát két-dimenziós hisztogrammon (dot plot) jelenítettük meg, amely 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 pixelekből. A sejtfelszíni antigének kolokalizációját a kettősen jelölt sejtek konfokális képeiből határoztuk meg a Pearson-féle keresztkorrelációs koefficiens segítségével:

$$\frac{\sum_k (I_k - I_{\text{átlag}})(J_k - J_{\text{átlag}})}{\sqrt{\sum_k (I_k - I_{\text{átlag}})^2 \sum_k (J_k - J_{\text{átlag}})^2}}$$

Ahol I_k és a J_k az adott pixelek fluoreszcencia intenzitása az első illetve a második képen, a $I_{\text{átlag}}$ és a $J_{\text{átlag}}$ pedig az első és a második kép átlagos fluoreszcencia intenzitása. A nagyon alacsony intenzitású pixeleket nem vettük figyelembe az analízis során. A keresztkorrelációs koefficiens teoretikus maximuma azonos képek esetén +1, minimuma -1 lehet. Az +1 a vizsgált receptorok teljes együttállását, a 0-hoz közeli érték a jelölések függetlenségét, míg a -1 a teljes antikorrelációt jelzi. A kolokalizációs értékek számítását LabView (National Instruments, Austin, TX) környezetben erre a célra írt programmal végeztük.

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 488 nm, 532 nm, 633 nm-en volt (Sebestyén Z és mtsai, 2002). Röviden összefoglalva a sejtek autofluoreszcenciáját a törmelék és az elpusztult sejtek kizárásával, 488 nm-en gerjesztve az FL1 csatornában mértük 530/30 nm-es sávszűrő segítségével. A donor molekula fluoreszcencia intenzitását 532 nm-en történő gerjesztést követően az FL4 csatornában mértük 585/42 nm sávszűrőn keresztül, míg az akceptor molekula esetén 633 nm-en történő gerjesztést követően az FL6 csatornában detektáltunk a 650 nm-es felüláteresztő szűrővel. A FRET intenzitás meghatározásához 532 nm-en végeztük a gerjesztést és az FL5 csatornában detektáltunk a 650 nm-es felüláteresztő szűrőt alkalmazva. Az energiatranszfer hatékonyságot sejtenként határoztuk meg a ReFlex szoftvert alkalmazva (Szentesi G és mtsai, 2004). 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 két hatékony siRNS antiszensz szálának szekvenciája a következő volt: AUGUCUUCAGGAUUCGUUCUU (CD44 siRNS-4), UAUUCAAAUCGAUCUG CGCUU (CD44 siRNS-5). Negatív kontrollként GFP elleni siRNS-t használtunk. A JIMT sejtek transzfektálását elektroporációval végeztük, melynek során az Amaxa cég (Köln, Németország) Nucleofector készülékét használtuk a gyártó útmutatásának megfelelően. 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 inkubációt követően az esetlegesen nem internalizálódott receptorok eltávolítására 3 percen át tartó savas (0.5 M NaCl, 0.1 M glicin, pH 2.5) mosást alkalmaztunk. Ezt követően a sejteket PBS-ben mostuk és szuszpendáltuk. Az internalizálódott trastuzumabból származó jelet áramlási citométerrel detektáltuk, majd az internalizálódott frakció arányát a savasan kezelt minták átlagos fluoreszcencia intenzitásának és a savas mosással nem kezelt kontroll sejtek fluoreszcencia intenzitásának hányadosaként számoltuk ki.

4. 15 Western blot analízis és immunprecipitáció

A sejtlizátumot a sejtek PBS-sel történő mosását követően lízis puffer felhasználásával készítettük. A lízis puffer a sejtek teljes feltárására alkalmas és a következő összetevőkből állt: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 Complete Mini (Roche, Mannheim, Németország) proteáz inhibitor koktél tablettá/10 ml puffer, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 10 mM β-glicerol foszfát és 10 mM Na₄P₂O₇. A lízis pufferrel való 10 perces jégen történő inkubálást követően a sejtlizátumot centrifugáltuk. A vizsgálandó fehérjék molekuláris szintű kapcsolatának elemzéséhez immunprecipitációt alkalmaztunk, melynek során a sejtlizátumot 1 órán át 4 fokon a megfelelő antitestekkel inkubáltuk. ErbB2 ellen Ab3-OP15 antitestet (Calbiochem-Merck Biosciences, Schwalbach, Németország), ErbB1 ellen F4 (E3138, Sigma, Schnellendorf, Németország) antitestet és a CD44 ellen Hermes-3 antitestet használtunk. 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. A membránhoz kötött fehérjéket a következő antitestekkel jelöltük meg a gyártó javaslatának megfelelő hígítást alkalmazva: Ab3-OP15 az ErbB2, F4 az ErbB1, Hermes3 a CD44 és PY99-sc7020 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a foszforilált tirozin jelölésére. A jelölt molekulák detektálására peroxidázzal konjugált egér elleni IgG-t és a kemilumineszcencia kimutatására kifejlesztett gyorsesztesztet (Enhanced chemiluminescence kit, Amersham, Freiburg, Germany) alkalmaztunk.

4. 16. CD44 *in vivo* standard ELISA

A kísérleteink során alkalmazott sCD44std instant ELISA kit (Bender MedSystems, Ausztria, Bécs) egy enzimatis reakción alapuló próba, mely alkalmas az oldható CD44 szintjének kvantitatív meghatározására mind sejt kultúrák felülúszójából, mind szérumból. JIMT-1 sejteket 24-lyukú sejttenyesztő lemezen növesztettük a konfluencia eléréséig. A sejttenyesztő médium eltávolítását követően a sejt kultúrát kétszer 1 mg/ml BSA tartalmú Hank's pufferrel mostuk (pH 7.4). A sejteket 200 µl térfogatban előkezeltük 30 percig jégen ezt követően tovább kezeltük 60 percig, 37 °C-on (EGF: 50 ng/ml, HA: 20 mg/ml, trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, heregulin: 20 µg/ml) és vizsgáltuk a kezelések CD44 sheddinget indukáló hatását. A felülúszókat összegyűjtöttük és a sejttörmelék eltávolításának érdekében centrifugáltuk (400 g, 10 perc). A lehasított, oldható CD44 koncentrációjának meghatározásához 20 µl felülúszót és 130 µl desztillált vizet adtunk a próbalemezhez. A mintákat 3 órán át, szobahőmérsékleten, horizontális keverés közben inkubáltuk, melynek során a mintalemezhez adszorbeált antitestekhez kötődött a mintában levő CD44 majd ehhez a komplexhez kötődött egy tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitest. A nem kötődött molekulákat mosással távolítottuk el, majd 10 percig inkubáltuk a mintákat sötétben a szubsztrátot (tetrametil-benzidin) tartalmazó oldattal. A keletkezett színes termék koncentrációját 450 nm-en mértük. Az oldható CD44 detektálási határa ezzel a módszerrel a

gyártó információja alapján 0,016 ng/ml. A SCID egerekből származó hígítatlan szérum oldott CD44 tartalmát a fentiekkel azonos módon határoztuk meg.

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 4%-os formaldehiddel fixáltuk 10 percen át szobahőmérsékleten, majd 0,1 %-os TritonX-100+ 0,3 % BSA oldattal permeabilizáltuk. A fixált és permeabilizált sejteken a CD44 molekula intracelluláris doménjét nyúlban termeltetett poliklonális antitesttel (hígítás 1:100), az extracelluláris domént AlexaFluor 647-Hermes3 monoklonális antitesttel jelöltük 90 percen át szobahőmérsékleten (Marhaba és Zoller, 2004). A nem kötődött antitestek kimosását követően AlexaFluor488 festékkel jelölt nyúl ellenes másodlagos antitestet alkalmaztunk. A jelölt mintákat Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Az Alexa-488-at 488 nm gerjesztettük és 505-530 nm-en detektáltuk. Az 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 áthallás megelőzésére az egyes csatornákat külön-külön vettük fel 512×512 pixelméretben.

A fluoreszcens képeket 1 µm-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 karcolási próba (*in vitro* scratch assay) alkalmazásával. A próba egyszerű módon teszi lehetővé a sejtmigráció mérését (Liang, Park és mtsai, 2007) oly módon, hogy a

konfluens JIMT-1 kultúrában pipettaheggyel egy ~ 1 mm-es sejtmentes sávot húzunk. A sejtörmeléket kétszeri sejttenyésztő médiummal való mosással távolítjuk el. A sejteket különböző módon kezeltük (EGF: 50ng/ml, HA: 20mg/ml, trastuzumab, pertuzumab, cetuximab: 20µg/ml, heregulin: 50ng/ml) 24 órán át 0,1% szérumtartalmú médiumban. 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.

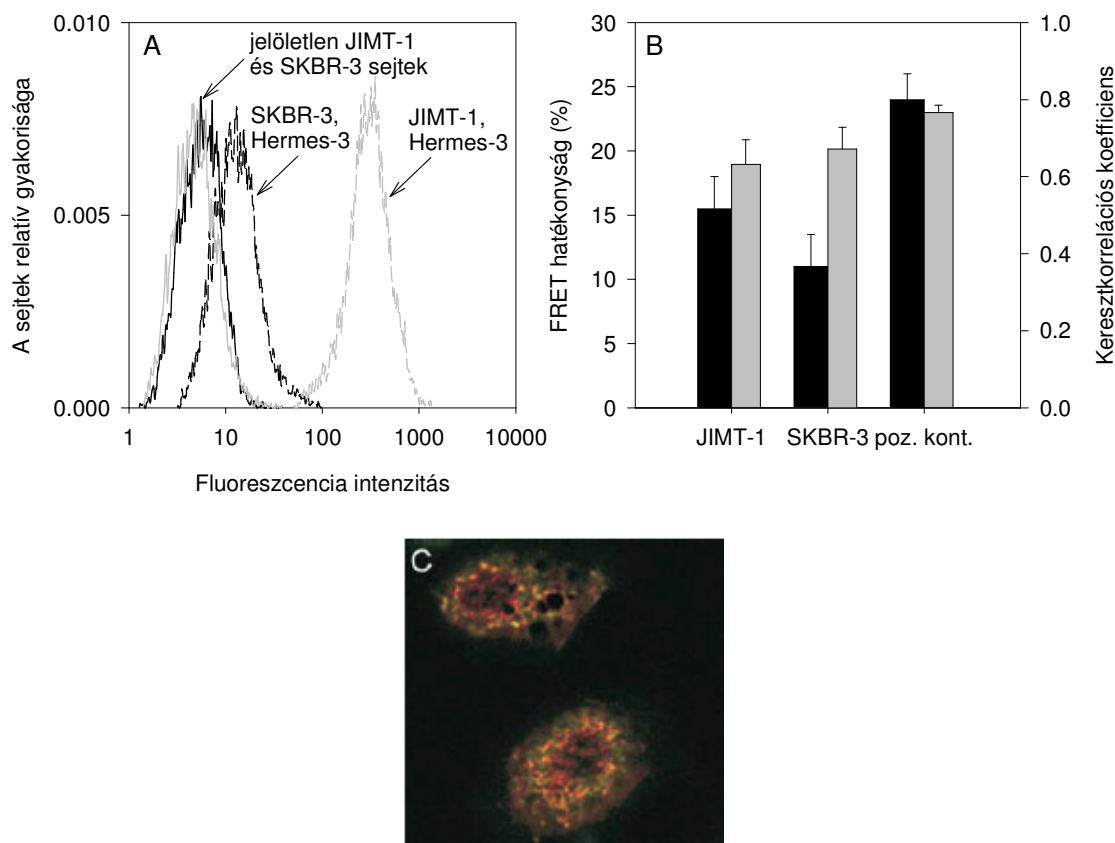
4.19. Statisztika

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 (Marhaba és Zoller, 2004). Irodalmi adatok a CD44 és ErbB2 molekulák közötti kapcsolatot támasztják alá (Bourguignon, Zhu és mtsai, 1997; Bourguignon, Zhu és mtsai, 2001; Ghatak, Misra és mtsai, 2005). Az ErBb2 fokozott expressziójának jelentősége ismert, ugyanakor az ErbB2 ellenes, klinikailag hatékony trastuzumabbal szemben máig nem ismert módon rezisztencia alakul ki. Mivel a trastuzumab rezisztencia háttérben álló mechanizmusok nem teljesen ismertek, a jelenség értelmezése jelentős terápiás lehetőségeket rejt magában. 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. Vizsgálataink során egyrészt a JIMT-1 sejtvonalat alkalmaztunk, amely *in vitro* teljesen (Tanner, Kapanen és mtsai, 2004) *in vivo* pedig részlegesen (Barok, Isola és mtsai, 2007) rezisztens trastuzumabbal szemben; másrészt egy trastuzumab szenzitív emlőtumor (SKBR-3) sejtvonalat. E két modell sejtvonalon vizsgáltuk a CD44 expressziós szintjét. 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) (4/A ábra).



4. ábra A CD44 és az ErbB2 mikrométeres és nanométeres skálán is kolokalizációt mutat.

A: JIMT-1 sejteken a CD44 áramlási citometriával meghatározott relatív expressziós szintje közel $2,3 \pm 0,3$ millió molekula/sejt. **B:** CD44 és ErbB2 molekulák közötti normalizált FRET mérési eredményeink $16 \pm 3\%$ -os értéket adtak JIMT-1, és $10 \pm 3\%$ -os SKBR-3 sejtek esetén (fekete oszlop). A kolokalizációt kvantifikáló keresztkorrelációs koeficiens értéke CD44 és ErbB2 között $0,612$, ami nagyfokú kolokalizációra utal (szürke oszlop). Pozitív kontrollként az ErbB2 különböző lokalizációjú doménjeiből származó jelet tekintettük. **C:** JIMT-1 sejteken jelölt ErbB2 (AlexaFluor488-2C4, vörös) és CD44 (AlexaFluor647-Hermes3, zöld) konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készült felvétele, a kolokalizációt mutató területek sárga színűek.

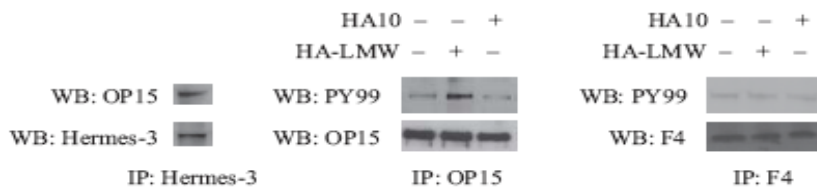
A CD44 általunk mért fokozott expressziója nem csupán fent említett ErbB2 és CD44 közötti kapcsolat miatt érdekes, hanem felveti annak lehetőségét, hogy a JIMT-1 sejtvonal közvetlenül az őssejtekből sejtekből fejlődött ki, mivel az irodalomban a CD44 fokozott expressziót az emlőtumor őssejtek egyik markereként írták le (Al-Hajj, Wicha és mtsai, 2003). Mivel irodalmi adatok a CD44 és ErbB2 molekulák interakcióját mutatták ki petefészekdaganatban, felmerült annak lehetősége, hogy ez a kapcsolat emlőtumorban is

fennáll. A vizsgált molekulákra jelölt konfokális mikroszkóppal készített felvételek analízise során a keresztkorrelációs koeficiens értéke CD44 és ErbB2 között 0,612-nek adódott JIMT-1, és 0,602-nek SKBR-3 sejteken (4/B, C ábra). Pozitív kontrollnak az ErbB2 molekula két különböző extracelluláris kötőhelye közötti keresztkorrelációs koeficiens értékét tekintettük, amely 0,615 volt. A pozitív kontroll valamint a CD44-ErbB2 közötti érték közötti csekély különbség a vizsgált molekulák közötti jelentős kolokalizációra utalt a mikroszkóp ~200 nm-es felbontási tartományában.

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (Mocanu, Fazekas és mtsai) 2-10 nm-es távolságban jöhet létre, így az áramlási citometriás energia transzfer mérés a molekulák együttállásán túl a molekulák közötti esetleges funkcionális kapcsolat vizsgálatát teszi lehetővé. 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 (4/B). Ezek az értékek a CD44 és ErbB2 közötti molekuláris szintű asszociációra utalnak, mivel irodalmi adatok 5%-os FRET értéktől molekuláris asszociáció létrejöttét igazoltnak tartják (Szollosi, Tron és mtsai, 1984). 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 (5/D ábra, bal oldali ábrarész). A CD44-ErbB2 kapcsolatot leíró modell feltételezi, hogy a CD44-ErbB2 komplexet a HA képes aktiválni. Ezt a feltételezést igazolta az az eredmény, amelyben a nagy molekulatömegű HA fokozta az ErbB2 tirozin foszforilációját, míg kis molekulatömegű HA-val történő kezelést követően nem volt megfigyelhető az aktiváció (5/D ábra, középső ábrarész). Egyes tumorokban, például fej- és nyak- laphám tumorban (HNSCC) (Bourguignon, Gilad és mtsai, 2006) megfigyelték a CD44-nek az ErbB1-gyel való kapcsolatát is. Kísérleteink során azonban ez a kapcsolat nem volt kimutatható ErbB1 foszforiláció vizsgálatával (5/D ábra, jobb oldali ábrarész).

Eredmények és megbeszélésük

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



5. ábra CD44 és ErbB2 molekulák közötti kapcsolat vizsgálata western blottal.

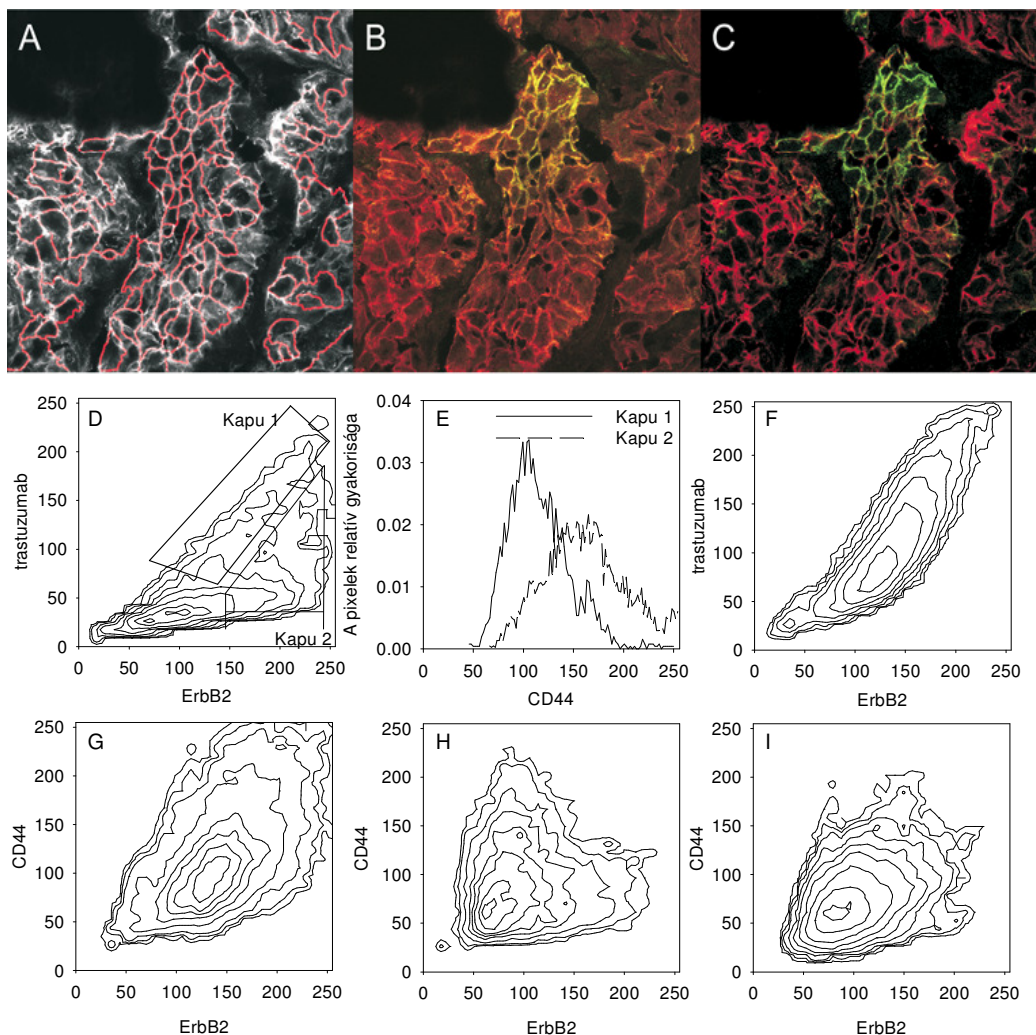
Anti-CD44-gyel való immunprecipitációt követően anti-ErbB2 antitesttel (OP15) végzett western blot (bal oldali ábrarészlet). Az ErbB2 (középső ábrarészlet) és az ErbB1 (jobb oldali ábrarészlet) immunprecipitációját követően a két fehérje foszforilációját foszfortirozin ellenes antitesttel (PY99) vizsgáltuk. Nagy móltömegű hialuronsavval (HA-LMW) végzett stimulálás fokozta az ErbB2 foszforilációját (középső ábrarészlet) és hatástalan volt az ErbB1 foszforilációjára (jobb oldali ábrarészlet). A kis molekulatömegű hialuronsav (HA10) egyik esetben sem fokozta a tirozinfoszforiláció mértékét.

5.2 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. Az anyagok és módszerek fejezetben leírt jellemzői miatt ez a beltenyésztett egértözs megfelelő a tumorimmunológiai vizsgálatokhoz. A JIMT-1 sejteket subcután injekcióval jutattuk az állatokba, majd ezzel egy időben megkezdtük a trastuzumabbal illetve a kontroll egereknél a fiziológiás sóoldattal való kezelést. A trastuzumab kezelést intraperitoneálisan (i.p.) injektált 5 µg/g-os oldattal

Eredmények és megbeszélésük

végeztük hetenként, a kontroll egereknél 100 µl fiziológias sóoldatot alkalmaztunk. A kezelést 9 héten át végeztük, majd mindkét csoportban fiziológias sóoldattal folytattuk további 6 hétig, majd az egereket CO₂-ban túllattattuk. A kinőtt xenograftokból 20 µm-es gyorsfagyasztott metszeteket készítettünk, melyeket háromszorosan jelöltünk CD44, ErbB2 és trastuzumab ellenes fluoreszcensen jelölt antitestekkel. A konfokális képek elemzését DipImage és Matlab programkörnyezetben végeztük, melynek során a sejtmembrán azonosítására az ún. „manually-seeded watershed” algoritmust alkalmaztunk (6/A ábra). Ezzel a módszerrel lehetővé vált a sejtmembránban a fluoreszcencia intenzitás pixelenkénti meghatározása. 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 pixelekből. Mivel az egér sztromális szöveti sejtjei sem a CD44-t, sem az ErbB2-t nem expresszálják, módszerünkkel kizárólag a JIMT-1 sejteket elemeztük. Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy az ErbB2 expressziója a trastuzumab kezelés befejezését követően visszatért a kontroll állatokban megfigyelt szintre (Barok, Isola és mtsai, 2007), a trastuzumab pedig eltávolításra került a keringésből, mivel az antitest fél-életideje 25 nap (Bruno, Washington és mtsai, 2005). A dolgozatban összegzett kísérletekben kialakult xenograftok vizsgálata során azonban azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy az ErbB2 expressziója (vörös) nem mutat szoros korrelációt a kötődött trastuzumab szintjével (zöld) (6/B ábra) 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



6. ábra A CD44 fokozza a trastuzumab internalizációját JIMT-1 xenograftokon. A-E: 6 héttel a trastuzumab kezelés befejezése utáni xenograftokból készült metszetek immunhisztokémiai jelölése. A metszeteken hármas jelölést alkalmaztunk a következőképpen: AlexaFluor488-ErbB2-76.5 (ErbB2 ellenes antitest), Cy3-anti humán IgG (a trastuzumabot ismerte fel) és AlexaFluor647-Hermes-3 (CD44 ellenes antitest). **A:** az alkalmazott algoritmussal azonosított sejtmembrán vörössel jelölve. A kettős színnel jelölt metszetek a vizsgált intenzitások közötti korrelációt szemléltetik. **B:** Vörös: ErbB2, zöld: trastuzumab. **C:** vörös: CD44, zöld: trastuzumab. **D:** az 1 kapu illetve a 2 kapu azokat a pixelrégiókat határolják körül, ahol a trastuzumab/ErbB2 arány magas (kapu 1) illetve alacsony (kapu 2). **F:** 15 hétig trastuzumabbal kezelt egerek xenograftjából készített metszeteken jelölt ErbB2 (AlexaFluor488-ErbB2-76.5) és trastuzumab (Cy3-anti humán IgG) közötti pozitív korreláció. **G-I:** A CD44 és ErbB2 expressziók korrelációja **G:** fiziológias sóoldattal 15 hétig kezelt egerekben, **H:** trastuzumabbal 15 hétig kezelt egerekben **I:** és 9 hétig trastuzumabbal kezelt, majd 6 hétig fiziológias sóoldattal kezelt egerekben .

Eredmények és megbeszélésük

megfigyelt jelentős intenzitását. A kérdés értelmezése kapcsán vizsgáltuk a CD44 expressziós szintjét is oly módon, hogy a 6/D ábrán jelölt kapuknak megfelelően elemeztük az adott pixelekből a CD44 expressziós szintjét. Eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab/ErbB2 arány negatív korrelációt mutatott a CD44 expressziós szintjével (6/D, E ábra), 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 (6/G ábra). A trastuzumab kötődésében megfigyelt heterogenitás háttérében a trastuzumab lokális kötődésben illetve internalizációjában való eltérés állhat. A xenograftok elemzésével mindkét lehetőséget megvizsgáltuk. A trastuzumab lehetséges eltérő kötődését olyan xenograftokból készült metszeteken vizsgáltuk, ahol a trastuzumab kezelés 15 héten át tartott. A folytonos trastuzumab kezelést követően szoros összefüggést találtunk az ErbB2 expressziója és a kötődött trastuzumab szintje között (6/F ábra), ezen eredmény alapján trastuzumab szintjében tapasztalt heterogenitás háttérében nem állhat a kötődésbeli különbség.

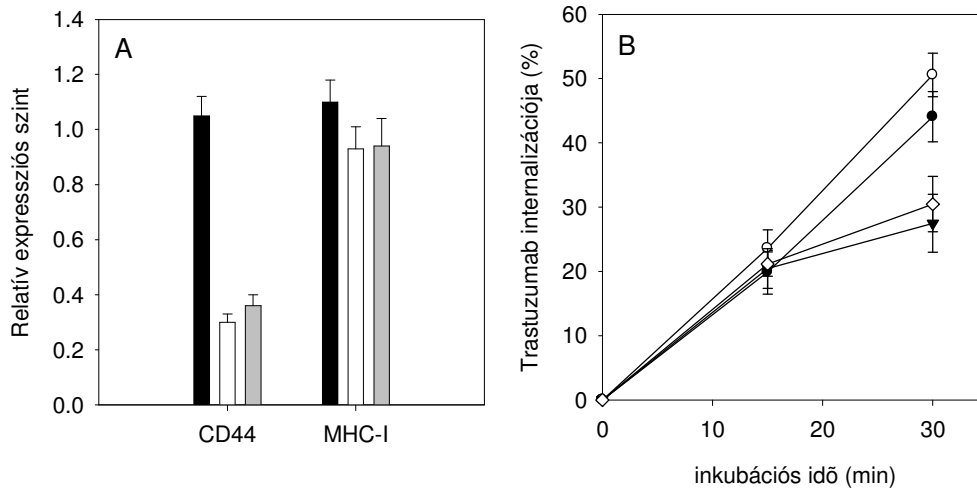
A tapasztalt eltérő trastuzumab intenzitás háttérében álló másik alternatíva a különböző trastuzumab internalizáció volt. A trastuzumab internalizáció fluoreszcencia intenzitáson alapuló kvantifikálására nem volt lehetőségünk az alacsony jel-zaj arány miatt, ezért alternatív lehetőségként a CD44 és ErbB2 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. A kontroll egerekben (6 ábra/G) és a trastuzumab kezelés leállítását követően (6 ábra/I) pozitív korreláció volt megfigyelhető a CD44 és ErbB2 expressziója között. Érdekes módon a trastuzumab kezelés alatti xenograftokból készült metszeteken az előzőekkel ellentétes módon negatív korrelációt tapasztaltunk (6 ábra/H), vagyis azokon a területeken, ahol a CD44 expressziója magas volt alacsony ErbB2

expressziót detektáltunk és fordítva. 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 (6/H ábra). 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.

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

In vivo kísérleti eredményeink a CD44 expresszió szerepét igazolták az ErbB2 trastuzumab mediálta internalizációjában. A CD44 expresszió a trastuzumab internalizációban betöltött szerepét egy másik megközelítésben *in vitro*, CD44 elleni kis interferáló RNS alkalmazásával is vizsgáltuk. Előkísérleteinkben két siRNS (CD44-siRNS-4 és CD44-siRNS-5) bizonyult hatékonyak a CD44 expresszió gátlásában, alkalmazásuk során megközelítőleg 70%-kal csökkent a CD44 expressziója (7. ábra/A bal oldali ábrarészlet). Az siRNS-ek specifikitását egy irreleváns fehérjére, az MHC-I molekulára kifejtett hatásuk alapján ellenőriztük. Mivel a CD44 ellenes siRNS-ek nem okoztak szignifikáns változást az MHC-I expresszióban, a CD44 kifejeződésre kifejtett hatás specifikus volt (7. ábra/A jobb oldali ábrarészlet). 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 (7. ábra/B).



7. ábra A CD44 siRNS gátolja a trastuzumab internalizációját.

A: A hisztogram a CD44 illetve az MHC-I expressziós szintjét mutatja áramlási citometriás mérési adatok alapján számolva 48 órával a transzfekciót követően GFP siRNS-sel (fekete), CD44siRNS-4-gyel (fehér) és CD44siRNS-5-tel (szürke) transzfektált JIMT-1 sejtekben. **B:** A trastuzumab internalizációja mock transzfektált (●), GFP siRNS-sel (○), CD44siRNS-4-gyel (▼) és CD44siRNS-5-tel (◇) transzfektált JIMT-1 sejteken. (100%= 0 percen a sejtmembránhoz kötődött trastuzumab). A 30 perces kezelés során mindkét siRNS-sel transzfektált sejtben szignifikánsan különbözött a trastuzumab internalizációja a GFPsiRNS-sel transzfektálttól ($p < 0,05$).

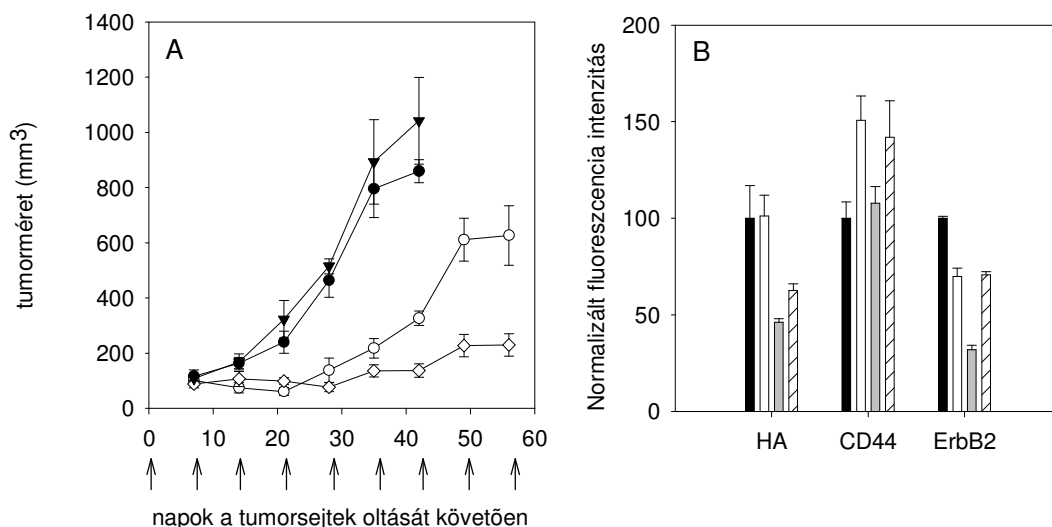
CD44 ellenes siRNS-sel illetve a JIMT-1 xenograftokon végzett kísérleteink megerősítették a CD44-nek az ErbB2 trastuzumab mediálta internalizációban játszott szerepét. A jelenséget többféleképpen értelmezhetjük. Ismert, hogy a CD44 kapcsolatban áll az aktinnal (Bourguignon, Gilad és mtsai, 2006), és az endocitotikus illetve poszt-endocitotikus folyamatok szintén szoros összefüggést mutatnak a citoskeletális rendszerrel (Rodriguez-Boulan, Kreitzer és mtsai, 2005). 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.

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

Kísérleti eredményeink a CD44 szerepét igazolták a trastuzumab internalizációjában *in vivo* és *in vitro*. Irodalmi adatok a trastuzumab rezisztencia többféle értelmezését adják, ugyanakkor egyik leírás sem teljesen bizonyított. 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) (Yoshihara, Kon és mtsai, 2005), trastuzumabbal, illetve ezek kombinációjával való kezelést közvetlenül a tumorsejtek injektálását követően elkezdtük. Munkacsoportunk korábbi eredményei igazolták, hogy a JIMT-1 sejtek (melyek *in vitro* trastuzumab rezisztensek) a SCID egerekbe való beoltást követően indított trastuzumab kezelésre reagáltak az első 28 napos időszakban (Barok, Isola és mtsai, 2007). Kísérletünkkel vizsgálni kívántuk a CD44 és hialuronsav szerepét a trastuzumab rezisztenciában és esetlegesen értelmezni a szenzitív-rezisztens periódus változásait. A kezeléseket során közel 60 napig nyomon követtük a xenograftok méretbeli változásait, eredményeinket foglalja össze a 8. ábra. Mérési értékek azt mutatják, hogy a 4-MU kezelés trastuzumabbal kombinálva (◇) lényegesen hatékonyabban gátolta a tumor növekedését, mint a trastuzumab monoterápia (8/A ábra). Ugyanakkor érdekes módon a 4-

MU kezelésnek önmagában nem volt tumornövekedést gátló hatása (▼) (8/A ábra) annak ellenére, hogy alkalmazása közel 40%-kal csökkentette a hialuronsav mennyiségét JIMT-1 tumorszövetben (8/B ábra).

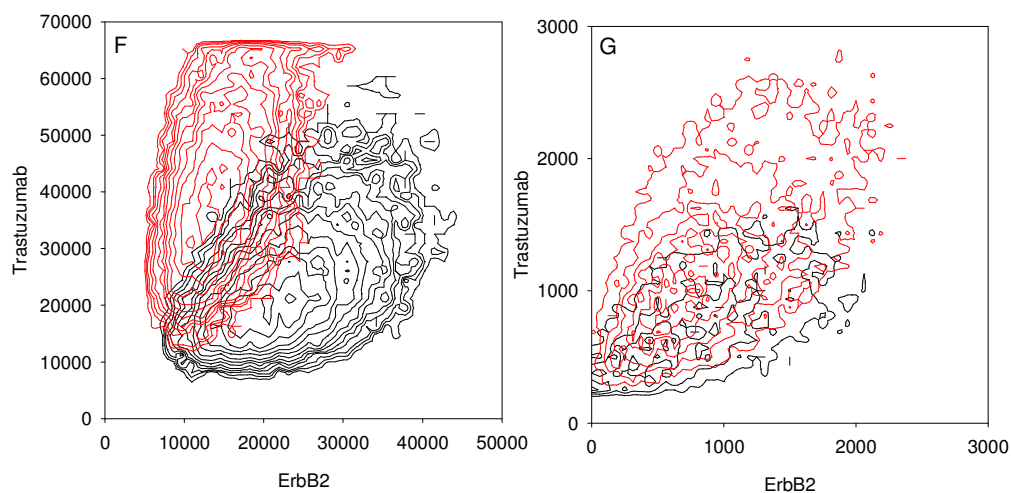
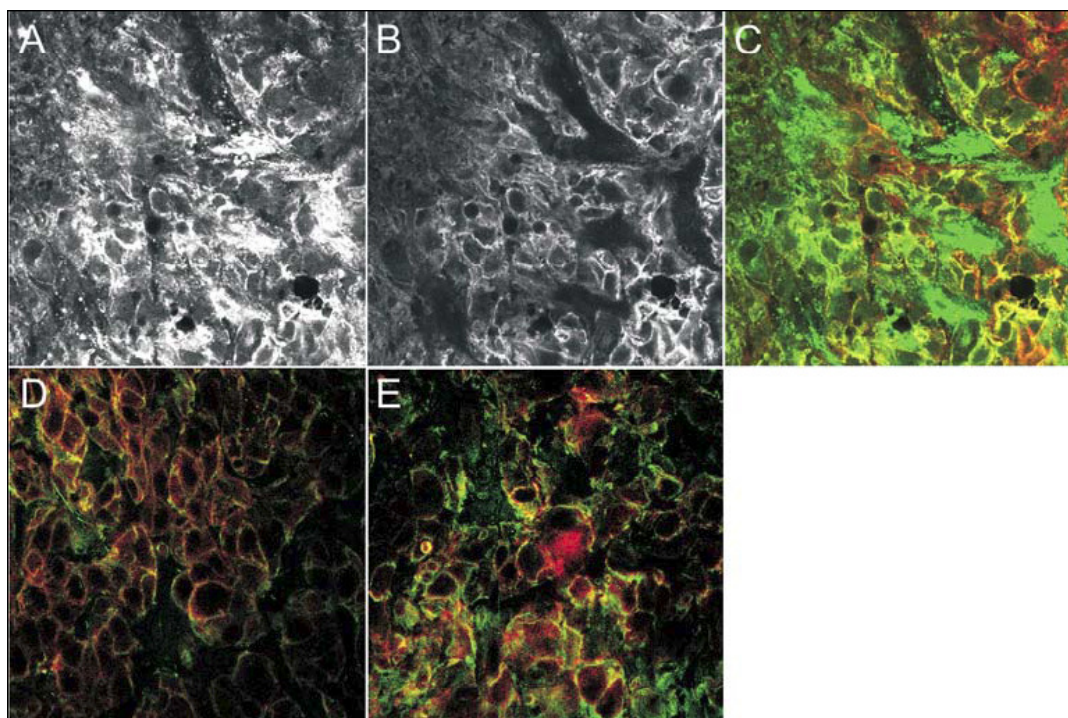


8. ábra. A 4-metilumbelliferon (4-MU) fokozza a trastuzumab tumornövekedést gátló hatását és gátolja az ErbB2 expressziót JIMT-1 xenograftokban.

A: A JIMT-1 sejtekkel beoltott SCID egereket fiziológiai sóoldattal (●), trastuzumabbal (○), 4-MU-val (▼) és trastuzumab+4-MU-val (◇) kezeltünk, majd nyomon követtük a tumor méretének változását. A 4-MU kezeléseket 8 óránként, a trastuzumab illetve fiziológiai sóoldattal való kezeléseket hetente végeztük, az utóbbiak időpontját az ábrán nyilak jelölik. **B:** A xenograftokból készült metszeteket fluoreszcensen jelöltük: a hialuronsavat bion-HABC-el és fluoreszcein-avidinnal, a CD44-t és az ErbB2-t megfelelő antitestekkel. A JIMT-1 sejtek membránját a megfelelő algoritlussal azonosítottuk. A hialuronsav, a CD44 és az ErbB2 expressziós szintjét értékeltük a különböző módon kezelt egerekben és a hisztogrammon a következő jelöléseket alkalmaztuk: trastuzumab (fehér), 4-MU (sávzott), trastuzumab+4-MU (szürke). A mért eredményeket a fiziológiai sóoldattal kezelt SCID egerek (fekete) esetén mért eredményekre normalizálva ábrázoltuk.

Irodalmi adatok a sejt-hialuronsav interakciót alapvető fontosságúnak írták le a rákos sejtek túlélésében és metasztázisában (Toole, Wight és mtsai, 2002). 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 háttérében 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 hialuronsav-mennyiség csökkentése mellett a CD44 expresszióját viszont fokozta a 4-MU kezelés, amit a CD44 hialuronsav által mediált dow-regulációjának csökkenésével értelmezhetünk (Knudson, Chow és mtsai, 2002). A trastuzumab kezelt sejteken megfigyelhető emelkedett CD44 szint a molekula csökkent sheddingjének lehet az eredménye, amit a trastuzumab kezelés válthat ki (1. később). A 4-MU kezelés nem csupán a CD44-re és a hialuronsavra volt hatással, hanem leszabályozta 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 (6. ábra). Összegzésként elmondható, hogy a 4-MU nem csupán fokozta a trastuzumab tumor-növekedést gátló hatását, hanem fokozta az ErbB2 trastuzumab mediálta internalizációját is (8/B ábra). Kísérleti eredményeink és korábbi irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a 4-MU az ErbB2 trastuzumab-kötő epitópjának szabaddá tétele (unmasking) fejt ki hatását. Feltételezésünk alátámasztásához szükséges volt a hialuronsav plazmamembránhoz való kolokalizációjának kimutatása. A xenograftokból készített metszeteken fluoreszcensen jelöltük a hialuronsav illetve a CD44 molekulákat. Eredményeink azt mutatták, hogy a hialuronsav a sejtmembránhoz közel helyezkedik el, ugyanakkor természetesen más szöveti részeken is megtalálható volt (9/A-C ábra).



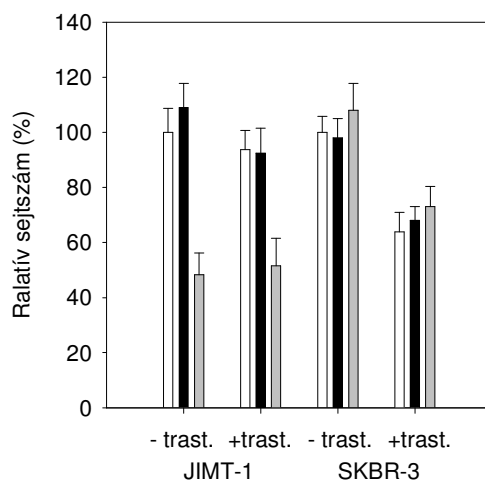
9. ábra. A hialuronsav szintetáz gátlása fokozta a trastuzumab kötődését az ErbB2-höz. A-C: Fiziológias sóoldattal kezelt egerekből készített metszeteken a hialuronsavat biotin-HABC-vel (A), a CD44-et monoklonális antitesttel (B) jelöltük. A színes ábra (C) a hialuronsav (zöld) és a CD44 (vörös) kolokalizációját szemlélteti. Trastuzumabbal (D) és trastuzumab+4-MU-val (E) kezelt egerekből készített metszetek trastuzumabot felismerő anti-humán IgG-vel (zöld) és ErbB2 ellenes antitesttel (vörös) jelölve. A kontur-plot (F) a trastuzumab fokozott kötődését mutatja az ErbB2-hoz a trastuzumab+4-MU kezelt egerekben (vörös) a csak trastuzumabbal kezelt egerekhez viszonyítva (fekete). A tengelyek a trastuzumab illetve az ErbB2 elleni antitest intenzitását mutatják a vizsgált pixeleken. *In vitro* tenyésztett JIMT-1 sejtek 2 napos 4-MU kezelése (G). A kontrol (fekete) és a 4-MU kezelt (vörös) sejteket egyaránt AlexaFluor488-trastuzumab és AlexaFluor647-2C4 antitesttel jelöltük. A 2C4 antitesttel az ErbB2 mennyiségét detektáltuk.

A következő lépésben a trastuzumab/ErbB2 arányt határoztuk meg kontrol és trastuzumab+4-MU kezelt egerekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab+4-MU-val kezelt egerekben a trastuzumab kötődése az ErbB2-höz lényegesen magasabb volt, mint a kontroll egerekben (9/D-E ábra). A képek kvantitatív elemzése megerősítette az előbbi eredményt: a trastuzumab nagyobb mértékben kötődött a 4-MU-val kezelt egerekben (9/F ábra). A következő kísérletben a 4-MU trastuzumab kötődésére kifejtett hatását *in vitro*, JIMT-1 sejtenyészetben is vizsgáltuk, melynek során a sejteket 48 órán át 4-MU-val kezeltük és a kezelést követően AlexaFluor488-trastuzumabbal és AlexaFluor647-2C4 antitesttel jelöltük. A 4-MU kezelés ebben az esetben is fokozta a trastuzumab kötődését az ErbB2-hoz, habár a kontrolltól való eltérés kisebb mértékű volt, mint az *in vivo* kísérletben (9/G ábra). A tapasztalt eredményhez az is hozzájárulhatott, hogy az *in vitro* kísérletben a trastuzumab nem volt képes kifejteni ErbB2-t down-reguláló hatását, mivel a trastuzumab kezelés csak 30 perces volt szemben az *in vivo* kísérlet több hetes kezelési időtartamával. A kísérlet tervezése során a trastuzumab kötő epitóp maszkolás-érzékenységet is figyelembe vettük, tehát azt a jelenséget, hogy egy másik, nagyméretű molekula (pl MUC-4) képes maszkolni trastuzumab kötőhelyét (Nagy, Friedlander és mtsai, 2005). Mivel az ErbB2-76.5 és a 2C4 antitesteket kötő epitópok kevésbé érzékenyek a maszkolásra, ezért feltételeztük, hogy az adott antitestek intenzitása az ErbB2 mennyiségét reprezentálja, így kontrollnak tekinthető. A 4-MU hatása nem feltétlenül csak a hialuronsav szintre kifejtet hatása révén értelmezhető. Irodalmi adatok szerint a 4-MU sokkal nagyobb mértékben gátolta a keratinociták proliferációját, mint amilyen mértékben gátolta a hialuronsav szintjét (Rilla, Pasonen-Seppanen és mtsai, 2004). Elképzelhető, hogy a 4-MU antiproliferatív és hialuronsav szintézist gátló hatása egymástól független. JIMT-1 sejteken illetve xenograftokon végzett, egymást alátámasztó *in vitro* és *in*

in vivo kísérleti eredmények megerősítik a hialuronsav általunk feltételezett maszkoló hatását az ErbB2 trastuzumabot kötő epitópja kapcsán.

5.5 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* (Tanner, Kapanen és mtsai, 2004).



10. ábra A CD44 expressziójának siRNS-sel való csökkentése gátolta a JIMT-1 sejtek proliferációját.

Azonos számú mock-transzfektált (fehér oszlop), GFP siRNS-sel transzfektált (fekete oszlop) és CD44 siRNS-sel transzfektált (szürke oszlop) sejteket tenyésztettünk 20 μ g/ml trastuzumab (+trast) jelenlétében vagy hiányában (-trast) 72 órán át. A sejtszámot a mock-transzfektált trastuzumabmal nem kezelt sejtek számára normalva ábrázoltuk.

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,

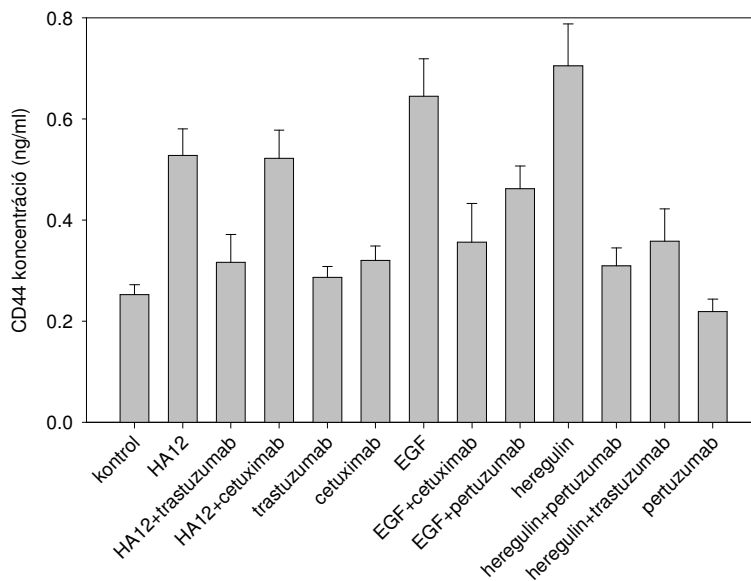
hiszen a CD44siRNS gátolja a trastuzumab internalizációját. Szintén nem téveszthető szem elől az a tény, hogy *in vivo* és *in vitro* a sejtfelszíni CD44-hez kötődő hialuronsav mátrix jelentős eltérést mutat komplexitásában, így az *in vivo* és *in vitro* eredmények nem összevethetőek. Az SKBR-3 sejtek 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).

5.6. 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) (Nagano és Saya, 2004). A hasítást követően az intracelluláris domén a sejtmagba transzlokálódik, a transzlokáció indukálta folyamatok alapvető fontosságúak a sejtek migrációjában (Nagano és Saya, 2004). 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. Hialuronsav fragmentekről (Sugahara, Hirata és mtsai, 2006) és az EGF-ről (Murai, Miyauchi és mtsai, 2006) kimutatták, hogy fokozzák a CD44 hasítását. A hialuronsav a CD44-re kifejtett hatása mellett a receptor mediált endocitózisra és endoszómális degradációra is hatással van (Tammi, Rilla és mtsai, 2001). 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

Eredmények és megbeszélésük

CD44-re az általunk modellként használt trastuzumab rezisztens JIMT-1 sejteken. A lehasított extracelluláris domén koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg, az internalizációt konfokális mikroszkópiával követtük nyomon. Ennek során az extracelluláris CD44 domént Hermes-3, az intracelluláris domént az erre a doménre specifikus anti-CD44-cyto antitesttel jelöltük. Eredményeink azt mutatták, hogy mindhárom általunk vizsgált vegyület (hialuronsav, EGF, heregulin) stimulálta a CD44 sheddingjét (11. ábra, $p < 0,05$), amit a CD44 endocitózisa és intramembrán proteolízise követett. A megfigyelt, CD44-re pozitív vezikulumok száma alapján elmondható, hogy a hialuronsav fragment, az EGF és a heregulin egyaránt fokozta a CD44 endocitózist (12. ábra).

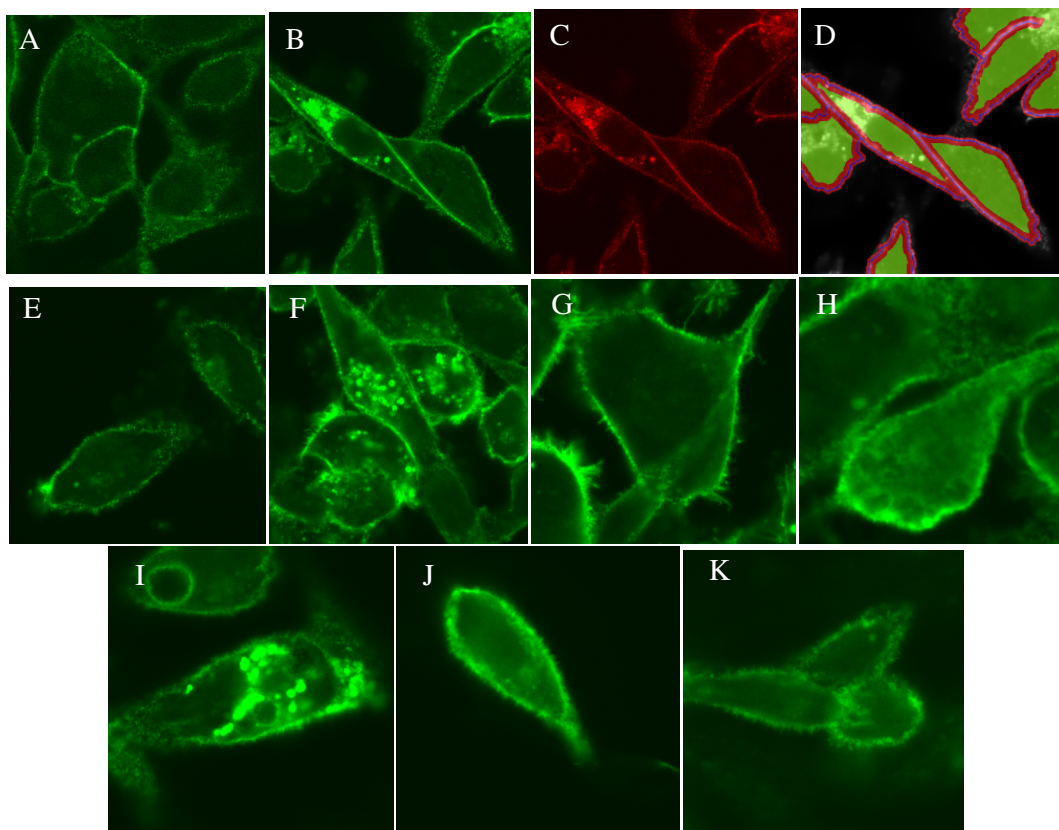


11. ábra A hialuronsav, az EGF és a heregulin fokozták a CD44 sheddingjét.

JIMT-1 sejteket monoklonális antitesttel előkezeltünk 30 percen át jégen, majd 100 $\mu\text{g/ml}$ hialuronsav oligoszachariddal, 10 nM EGF-fel illetve 10 nM heregulinnal kezeltünk 60 percig 37 °C-on. A sejtek felülűszóját összegyűjtöttük, majd a CD44 ektodomén koncentrációját ELISA-val határoztuk meg. Az ábra három független kísérlet átlagát mutatja be ($\pm\text{SD}$).

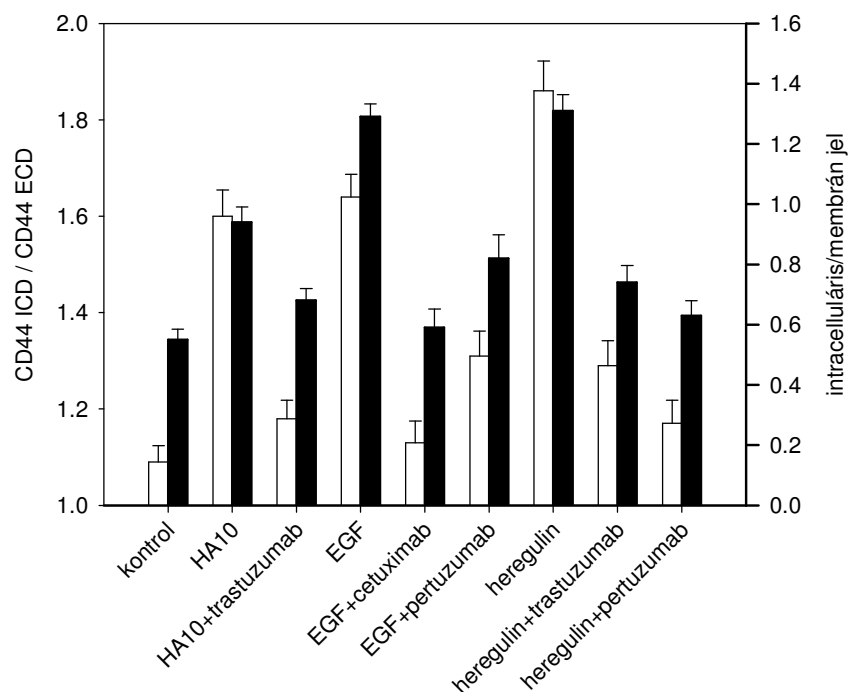
A konfokális mikroszkóppal készített felvételeket kvantitáltuk oly módon, hogy külön értékeltük az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást, valamint a sejtmembrán fluoreszcencia

intenzitását. A képek elemzésekor kapott anti-CD44-cyto és Hermes-3 arány megerősítette azt a korábbi megállapításunkat, hogy a hialuronsav oligomer, az EGF és a heregulin fokozta a CD44 endocitózist (13. ábra, $p < 0,05$). Az anti-CD44-cyto és Hermes-3 antitestekkel kapott intenzitások átfedése arra enged következtetni, hogy az endocitózis során az esetlegesen a sejt belsejébe került teljes antitest, valamint a hasított CD44 egyaránt akumulálódhat intracellulárisan.



12. ábra Konfokális mikroszkópiás felvételek az EGF-szerű növekedési faktorok, az ErbB1 és ErbB2 elleni antitestek CD44 sheddingre kifejtett hatásáról.

JIMT-1 sejteket növekedési faktorokkal, hialuronsavval valamint monoklonális antitestekkel kezeltünk fedőlemez-aljú kamrában egy éjszakán át. A kezelést követően fixáltuk, permeabilizáltuk és festettük a sejteket AlexaFluor647-Hermes3 CD44 elleni antitesttel (vörös), mely az extracelluláris doménhez kötődik. A CD44 intracelluláris doménjét elsődlegesen anti-CD44-cyto antitesttel, majd AlexaFluor488-anti-rabbit IgG (zöld) jelöltük. **A, B:** hialuronsav oligoszacharid, **D:** kezeletlen, kontrol sejtek, **E:** trastuzumab+hialuronsav oligoszacharid, **F:** EGF, **G:** cetuximab+EGF, **H:** pertuzumab+EGF, **I:** heregulin, **J:** trastuzumab+heregulin, **K:** pertuzumab+heregulin, **C:** képanalízis: A kék csík a membránt, a körülötte levő vörös sáv a membránként értelmezett pixeleket, a belső zöld terület pedig az intracelluláris teret jelöli.



13. ábra A 12. ábra konfokális felvételeinek kvantitatív analízise a CD44 internalizációjáról.

A fehér oszlopok a hasított CD44 arányát mutatják a CD44ICD/CD44ECD hányados alapján, melyet az anti-CD44cyto antitest (CD44ICD) és a Hermes-3 (a CD44 extracelluláris doménje elleni antitest, CD44ECD) háttérkorrigált fluoreszcencia intenzitásainak hányadosa alapján határoztunk meg. A fekete oszlopok az intracelluláris és membrán jelek hányadosai, melyek a CD44 internalizációt jellemzik.

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. Mindkét antitest az adott fehérje által mediált szignáltranszdukciós útvonalat blokkolja különböző mechanizmusokkal. 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 (Agus, Akita és mtsai, 2002): 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 (Tanner, Kapanen és mtsai, 2004). Az EGF hatás kisebb mértékű gátlásának az oka az lehet, hogy az ErbB1 homodimerként is aktív (Yarden és Sliwkowski, 2001) és a homodimerizációt nem gátolja a pertuzumab (Laux, Jain és mtsai, 2006). 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.

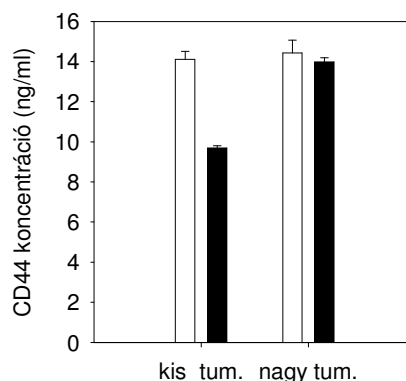
5.7. Trastuzumab hatása a CD44 sheddingjére *in vitro* és *in vivo*

A trastuzumab hatásmechanizmusa igen komplex és a trastuzumabbal szembeni rezisztencia mechanizmusa sem teljesen értelmezett. Ugyanakkor számos kísérleti eredmény támasztja alá, hogy a trastuzumab rezisztenciában az ErbB fehérjék mediálta szignáltranszdukciós útvonalak alapvető fontosságúak (Kumar, 2007) és az ErbB2 trastuzumab által gátolt sheddingjéről is rendelkezésünkre állnak irodalmi adatok (Molina, Codony-Servat és mtsai, 2001). Kísérleteink igazolták az ErbB2 és CD44 kapcsolatát JIMT-1 sejteken, illetve saját és irodalmi adatok az ErbB fehérjék szerepét a CD44 hasításában

(Murai, Miyauchi és mtsai, 2006), 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 (11-13 ábra). 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. Hasonló kapcsolatot írtak le a multidrog rezisztencia, a CD44 és az ErbB2 expressziója között, ahol az ErbB2-nek szerepe volt a P-glikoprotein hialuronsav mediálta indukciójában (Misra, Ghatak és mtsai, 2005).

In vitro eredményeinket, melyek a trastuzumab CD44 shedding gátló hatását mutatták *in vivo* is megvizsgáltuk JIMT-xenograftból vett mintákon. Hét hetes nőstény SCID egerekbe *subcutan* 5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk, majd az oltással azonos időpontban kezdtük a hetenkénti trastuzumab kezelést 5 $\mu\text{g/g}$ dózisokban. Kontrollként a fiziológiás sóoldattal, azonos körülmények között kezelt egereket vizsgáltuk. A trastuzumab korábbi kísérleteinkben szignifikánsan gátolta a tumor növekedését (Barok, Isola és mtsai, 2007; Palyi-Krekk, Barok és mtsai, 2007) ezért összehasonlításkor nem a kezelés időtartama, hanem azonos tumorméret esetén vettünk mintát. Vérmintavételkor a kontrol egerek 5 hetesek, a trastuzumab kezelt egerek 9-11 hetesek voltak, a tumor méret mindkét esetben 400 mm^3 körül volt (ezt tekintettük kis méretű tumornak) (14. ábra).

Átlagos tumorméret		
	kontrol	trastuzumab
kicsi	393	403
nagy	848	859

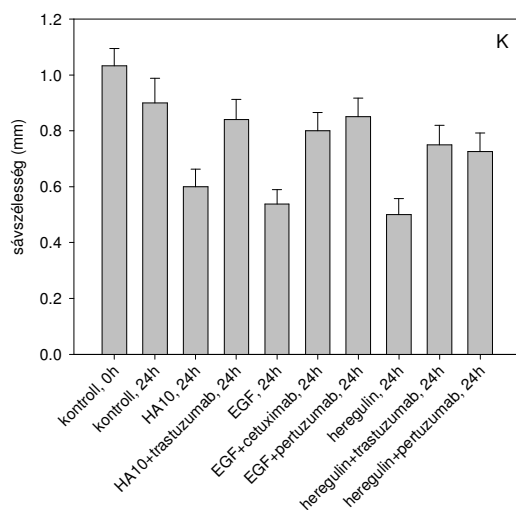
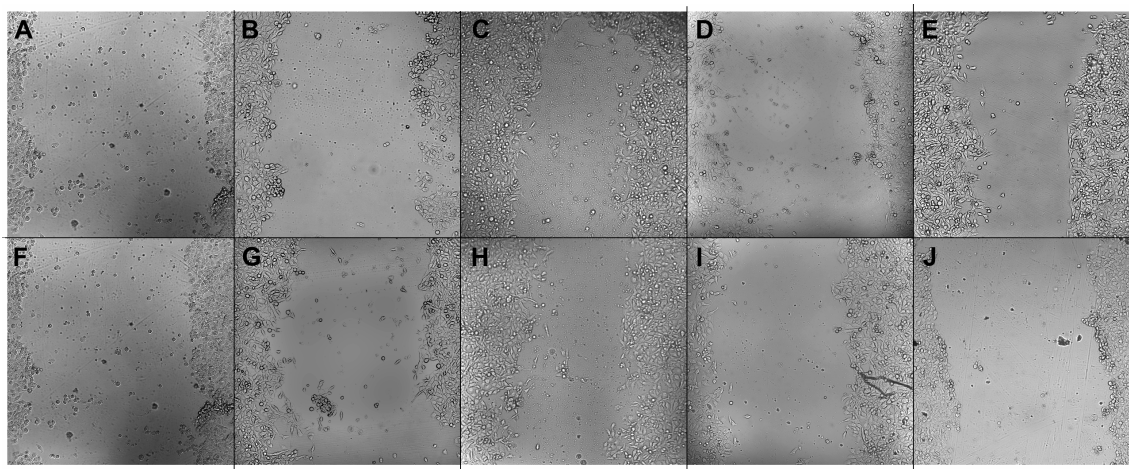


14. ábra. Trastuzumab gátolta a CD44 sheddingjét kisméretű JIMT-1 xenograft tumorban.

A SCID egerekből gyűjtött vérmintákat a tumorok mérete alapján két csoportba osztottuk: kisméretű tumornak tekintettük a trastuzumab kezelt egerekben 390 mm^3 -es, kontrol egerekben 400 mm^3 -es tumorokat, nagyméretűnek a fenti csoportokban a 848 mm^3 és 859 mm^3 -es tumorokat. Négy független kísérlet eredményének átlagát (\pm SD) szemlélteti az ábra, ahol a kontroll egerekben mért értékeket a fehér, a trastuzumabbal kezelt egerekben mért értékeket a fekete oszlopok mutatják.

Eredményeink azt mutatták, hogy a trastuzumab szignifikánsan ($p < 0.05$) csökkentette a vér CD44 koncentrációját. Mivel az általunk alkalmazott ELISA kit humán CD44-re volt specifikus, ezért az egérszövetekből lehasított CD44 által adott hibát kizártuk. Ez az eredmény párhuzamba hozható korábbi eredményeinkkel, amelyek azt mutatták, hogy a trastuzumab csökkentette vérben keringő daganatos sejtek számát (Barok, Balazs és mtsai, 2007). 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.

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



15. ábra A trastuzumab, a pertuzumab és a cetuximab hatása a hialuronsav, az EGF valamint a heregulin indukálta sejtmotilitásra JIMT-1 sejt kultúrában.

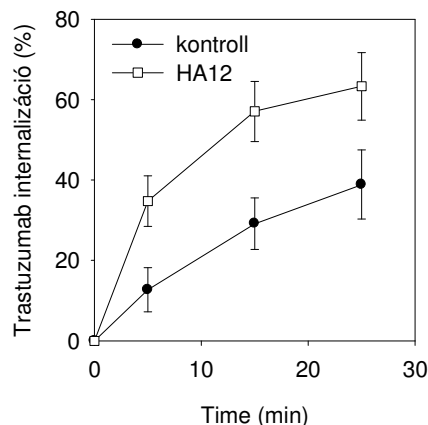
Konfluens JIMT-1 sejt kultúrákban pipettaheggyel sejtmentes sávot húztunk, majd 0 és 24h-nál készített transzmissziós felvételek alapján nyomon követtük a különböző kezelések hatását a sejtmotilitásra. **A:** kontroll 0h, **B:** kontroll 24h, **C:** hialuronsav oligoszacharid 24h, **D:** hialuronsav oligoszacharid+trastuzumab 24h, **E:** EGF 24h, **F:** EGF+cetuximab 24h, **G:** EGF+pertuzumab 24h, **H:** heregulin 24h, **I:** heregulin+trastuzumab 24h, **J:** heregulin+pertuzumab 24h. A felvételek azonos nagysággal készültek. **K:** a sejtmentes sáv szélességének analízise.

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 karcólási próbát (*in vitro* scratch assay) alkalmaztuk, amely módszer egyszerű módon teszi lehetővé a sejt-migráció mérését (Liang, Park és mtsai, 2007). 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 sejt-motilitásra 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.

5.9. 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.



16. ábra A hialuronsav oligoszacharid fokozza a trastuzumab internalizációját. JIMT-1 sejteket 100 µg/ml hialuronsav oligoszachariddal előkezeltünk 15 percig szobahőmérsékleten. A kezelt sejtekhez 20 µg/ml AlexaFluor647-trastuzumab jelenlétében inkubáltuk 15 percig jégen (a megfelelő antitestkötődés érdekében), majd 37 °C-on az ábrán jelölt időtartam alatt áramlási citometriás méréssel meghatároztuk az internalizált trastuzumab mennyiséget. Az ábra hat független kísérlet átlagát mutatja be (±SD).

5.10. Konklúzió

Munkánk során a trastuzumab rezisztencia kapcsán eddig nem elemzett területet a CD44 szerepét vizsgáltuk a rezisztencia mechanizmusával kapcsolatban. Eredményeink egyrészt megerősítették a CD44 és ErbB2 közötti kolokalizációt leíró irodalmi adatokat (Bourguignon, Zhu és mtsai, 1997), másrészt kiegészítették az eredeti modellt a receptorok közötti molekuláris szintű kapcsolatot FRET mérésekkel alátámasztva. Ígéretes, új megfigyelésünk, hogy a CD44 fokozott expressziója elsősorban a trastuzumab rezisztens sejtvonalakban volt megfigyelhető emlőtumoros és gyomortumoros (saját nem publikált adatok) sejtvonalakban egyaránt. Ezen eredményünk jól illeszkedik azoknak a megfigyeléseknek a sorába, amely sejtfelszíni receptorok jelentőségét írták le malignus elváltozásokban többek között egyes dukális emlőkarcinómáknál az ErbB2 (Slamon,

Godolphin és mtsai, 1989), akut mieloid leukémia (AML) esetén a CD33, non-Hodgkin limfómánál (NHL) a CD20 (Stern és Herrmann, 2005) fehérjékkel kapcsolatban. Vizsgálati eredményeink alátámasztják a CD44 szerepét az ErbB2 trastuzumab indukálta internalizációjában és antitest-kötő epitópjának „maszkolásában”, az utóbbi esetben megfigyelt funkció korrelál a MUC-4 molekula esetén megfigyelt hatással (Nagy, Friedlander és mtsai, 2005). Az EGF mitotikus és sejtmotilitásra kifejtett hatása függ a CD44 aktivációjától (Ellis, Schor és mtsai, 2007). A CD44 elsődleges ligandjának tekintett hialuronsav szükséges a szív mesenchyma ErbB2 és ErbB3 indukálta fejlődéséhez (Camenisch, Schroeder és mtsai, 2002). Megfigyeléseink alapján és az irodalmi adatok 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 gátlható volt.
- A tumorok metasztázisképzését meghatározó motilitási vizsgálataink megerősítették a CD44 shedding mérési eredményeinket az alkalmazott ErbB ellenes antitestekkel motilitást gátló hatásával kapcsolatban.

Összefoglalás és gyakorlati jelentőség

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.

7. Irodalomjegyzék

- Agus, D. B., R. W. Akita, et al. (2002). "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth." Cancer Cell **2**(2): 127-37.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-8.
- Auvinen, P., R. Tammi, et al. (2000). "Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival." Am J Pathol **156**(2): 529-36.
- Auvinen, P., R. Tammi, et al. (2005). "Expression of CD 44 s, CD 44 v 3 and CD 44 v 6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan." Histopathology **47**(4): 420-8.
- Bajorath, J., B. Greenfield, et al. (1998). "Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site." J Biol Chem **273**(1): 338-43.
- Barok, M., M. Balazs, et al. (2007). "Trastuzumab decreases the number of circulating and disseminated tumor cells despite trastuzumab resistance of the primary tumor." Cancer Lett.
- Barok, M., J. Isola, et al. (2007). "Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance." Mol Cancer Ther **6**(7): 2065-72.
- Baselga, J. (2001). "Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab)." Eur J Cancer **37 Suppl 1**: 18-24.
- Batra, J. K., P. G. Kasprzyk, et al. (1992). "Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5867-71.
- Bertram, J., M. Killian, et al. (1994). "Reduction of erbB2 gene product in mamma carcinoma cell lines by erbB2 mRNA-specific and tyrosine kinase consensus phosphorothioate antisense oligonucleotides." Biochem Biophys Res Commun **200**(1): 661-7.
- Bosma, M. J. and A. M. Carroll (1991). "The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses." Annu Rev Immunol **9**: 323-50.
- Bourguignon, L. Y. (2001). "CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **6**(3): 287-97.
- Bourguignon, L. Y., E. Gilad, et al. (2006). "Hyaluronan-CD44 interaction with leukemia-associated RhoGEF and epidermal growth factor receptor promotes Rho/Ras co-activation, phospholipase C epsilon-Ca²⁺ signaling, and cytoskeleton modification in head and neck squamous cell carcinoma cells." J Biol Chem **281**(20): 14026-40.
- Bourguignon, L. Y., K. Peyrollier, et al. (2007). "Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes actin polymerization and ErbB2 activation leading to beta-catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells." J Biol Chem **282**(2): 1265-80.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (1997). "Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation." J Biol Chem **272**(44): 27913-8.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (2000). "CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration." J Biol Chem **275**(3): 1829-38.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (2001). "CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration." J Biol Chem **276**(10): 7327-36.

- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, et al. (2001). "Hyaluronan promotes CD44v3-Vav2 interaction with Grb2-p185(HER2) and induces Rac1 and Ras signaling during ovarian tumor cell migration and growth." J Biol Chem **276**(52): 48679-92.
- Bruno, R., C. B. Washington, et al. (2005). "Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients with HER2+ metastatic breast cancer." Cancer Chemother Pharmacol **56**(4): 361-9.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." Mol Cell **12**(3): 541-52.
- Camenisch, T. D., J. A. Schroeder, et al. (2002). "Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors." Nat Med **8**(8): 850-5.
- Carraway, K. L., V. P. Ramsauer, et al. (2005). "Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs." J Cell Biochem **96**(5): 914-26.
- Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-16.
- Cohen, S. (1962). "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal." J Biol Chem **237**: 1555-62.
- Cuello, M., S. A. Ettenberg, et al. (2001). "Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2." Cancer Res **61**(12): 4892-900.
- de Larco, J. E. and G. J. Todaro (1978). "Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation." J Cell Physiol **94**(3): 335-42.
- Disis, M. L. and M. A. Cheever (1997). "HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer." Adv Cancer Res **71**: 343-71.
- Downward, J., Y. Yarden, et al. (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." Nature **307**(5951): 521-7.
- Ellis, I. R., A. M. Schor, et al. (2007). "EGF AND TGF-alpha motogenic activities are mediated by the EGF receptor via distinct matrix-dependent mechanisms." Exp Cell Res **313**(4): 732-41.
- Esteva, F. J., V. Valero, et al. (2002). "Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer." J Clin Oncol **20**(7): 1800-8.
- Freeman, M. (2000). "Feedback control of intercellular signalling in development." Nature **408**(6810): 313-9.
- Fry, D. W., A. J. Bridges, et al. (1998). "Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 12022-7.
- Gamett, D. C., G. Pearson, et al. (1997). "Secondary dimerization between members of the epidermal growth factor receptor family." J Biol Chem **272**(18): 12052-6.
- Gassmann, M., F. Casagrande, et al. (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." Nature **378**(6555): 390-4.
- Ghatak, S., S. Misra, et al. (2002). "Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway." J Biol Chem **277**(41): 38013-20.
- Ghatak, S., S. Misra, et al. (2005). "Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells." J Biol Chem **280**(10): 8875-83.

- Goebeler, M., D. Kaufmann, et al. (1996). "Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors." *J Cell Sci* **109** (Pt 7): 1957-64.
- Gottesman, M. M., T. Fojo, et al. (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nat Rev Cancer* **2**(1): 48-58.
- Guo, Y. J., G. Liu, et al. (1994). "Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer." *Cancer Res* **54**(2): 422-6.
- Izumi, Y., L. Xu, et al. (2002). "Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail." *Nature* **416**(6878): 279-80.
- Kawano, Y., I. Okamoto, et al. (2000). "Ras oncoprotein induces CD44 cleavage through phosphoinositide 3-OH kinase and the rho family of small G proteins." *J Biol Chem* **275**(38): 29628-35.
- Klapper, L. N., S. Glathe, et al. (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 4995-5000.
- Knudson, W., G. Chow, et al. (2002). "CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan." *Matrix Biol* **21**(1): 15-23.
- Kono, K., E. Sato, et al. (2004). "Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes." *Clin Cancer Res* **10**(7): 2538-44.
- Kono, K., A. Takahashi, et al. (2002). "Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer." *Cancer Res* **62**(20): 5813-7.
- Kopp, R., S. Classen, et al. (2001). "Predictive relevance of soluble CD44v6 serum levels for the responsiveness to second line hormone- or chemotherapy in patients with metastatic breast cancer." *Anticancer Res* **21**(4B): 2995-3000.
- Kumar, R. (2007). "ErbB-dependent signaling as a determinant of trastuzumab resistance." *Clin Cancer Res* **13**(16): 4657-9.
- Lane, H. A., A. B. Motoyama, et al. (2001). "Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling." *Ann Oncol* **12** **Suppl 1**: S21-2.
- Laux, I., A. Jain, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor dimerization status determines skin toxicity to HER-kinase targeted therapies." *Br J Cancer* **94**(1): 85-92.
- Lee, H. J., K. M. Jung, et al. (2002). "Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4." *J Biol Chem* **277**(8): 6318-23.
- Lee, K. F., H. Simon, et al. (1995). "Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development." *Nature* **378**(6555): 394-8.
- Levkowitz, G., H. Waterman, et al. (1999). "Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1." *Mol Cell* **4**(6): 1029-40.
- Liang, C. C., A. Y. Park, et al. (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nat Protoc* **2**(2): 329-33.
- Lin, A. and H. S. Rugo (2007). "The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations." *Curr Treat Options Oncol* **8**(1): 47-60.
- Lu, Y., X. Zi, et al. (2004). "Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells." *Int J Cancer* **108**(3): 334-41.
- Marhaba, R. and M. Zoller (2004). "CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation." *J Mol Histol* **35**(3): 211-31.

- Marmor, M. D., K. B. Skaria, et al. (2004). "Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**(3): 903-13.
- Menard, S., P. Casalini, et al. (1999). "Pathobiologic identification of two distinct breast carcinoma subsets with diverging clinical behaviors." *Breast Cancer Res Treat* **55**(2): 169-77.
- Mendelsohn, J. and J. Baselga (2006). "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer." *Semin Oncol* **33**(4): 369-85.
- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." *Nature* **378**(6555): 386-90.
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, et al. (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." *Nature* **376**(6538): 337-41.
- Misra, S., S. Ghatak, et al. (2005). "Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2." *J Biol Chem* **280**(21): 20310-5.
- Misra, S., B. P. Toole, et al. (2006). "Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells." *J Biol Chem* **281**(46): 34936-41.
- Mocanu, M. M., Z. Fazekas, et al. (2005). "Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines." *Cancer Lett* **227**(2): 201-12.
- Molina, M. A., J. Codony-Servat, et al. (2001). "Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells." *Cancer Res* **61**(12): 4744-9.
- Motoyama, A. B., N. E. Hynes, et al. (2002). "The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides." *Cancer Res* **62**(11): 3151-8.
- Murai, T., T. Miyauchi, et al. (2006). "Epidermal growth factor-regulated activation of Rac GTPase enhances CD44 cleavage by metalloproteinase disintegrin ADAM10." *Biochem J* **395**(1): 65-71.
- Nagano, O. and H. Saya (2004). "Mechanism and biological significance of CD44 cleavage." *Cancer Sci* **95**(12): 930-5.
- Nagata, Y., K. H. Lan, et al. (2004). "PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients." *Cancer Cell* **6**(2): 117-27.
- Nagy, P., E. Friedlander, et al. (2005). "Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line." *Cancer Res* **65**(2): 473-82.
- Nagy, P., A. Jenei, et al. (1999). "Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy." *Pathol Oncol Res* **5**(4): 255-71.
- Nagy, P., A. Jenei, et al. (1999). "Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy." *J Cell Sci* **112** (Pt 11): 1733-41.
- Nakamura, H., N. Suenaga, et al. (2004). "Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase." *Cancer Res* **64**(3): 876-82.
- Naor, D., R. V. Sionov, et al. (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." *Adv Cancer Res* **71**: 241-319.
- Ni, C. Y., M. P. Murphy, et al. (2001). "gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase." *Science* **294**(5549): 2179-81.

- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-87.
- Okamoto, I., Y. Kawano, et al. (1999). "Regulated CD44 cleavage under the control of protein kinase C, calcium influx, and the Rho family of small G proteins." J Biol Chem **274**(36): 25525-34.
- Okamoto, I., H. Tsuiki, et al. (2002). "Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors." Am J Pathol **160**(2): 441-7.
- Paik, S. and E. T. Liu (2000). "HER2 as a predictor of therapeutic response in breast cancer." Breast Dis **11**: 91-102.
- Palyi-Krekk, Z., M. Barok, et al. (2007). "Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer." Eur J Cancer.
- Peterson, R. M., Q. Yu, et al. (2000). "Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites." Am J Pathol **156**(6): 2159-67.
- Price-Schiavi, S. A., S. Jepson, et al. (2002). "Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance." Int J Cancer **99**(6): 783-91.
- Reid, A., L. Vidal, et al. (2007). "Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu)." Eur J Cancer **43**(3): 481-9.
- Riethmacher, D., E. Sonnenberg-Riethmacher, et al. (1997). "Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor." Nature **389**(6652): 725-30.
- Rilla, K., S. Pasonen-Seppanen, et al. (2004). "The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor." J Invest Dermatol **123**(4): 708-14.
- Ristamaki, R., H. Joensuu, et al. (1997). "Elevated serum CD44 level is associated with unfavorable outcome in non-Hodgkin's lymphoma." Blood **90**(10): 4039-45.
- Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer, et al. (2005). "Organization of vesicular trafficking in epithelia." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 233-47.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Crit Rev Oncol Hematol **19**(3): 183-232.
- Schechter, A. L., D. F. Stern, et al. (1984). "The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen." Nature **312**(5994): 513-6.
- Schulze, A., K. Lehmann, et al. (2001). "Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells." Genes Dev **15**(8): 981-94.
- Schulze, W. X., L. Deng, et al. (2005). "Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family." Mol Syst Biol **1**: 2005 0008.
- Sibilia, M. and E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." Science **269**(5221): 234-8.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**(4785): 177-82.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-12.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." N Engl J Med **344**(11): 783-92.
- Sliwkowski, M. X., J. A. Lofgren, et al. (1999). "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." Semin Oncol **26**(4 Suppl 12): 60-70.

- Song, E., P. Zhu, et al. (2005). "Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors." Nat Biotechnol **23**(6): 709-17.
- Stern, M. and R. Herrmann (2005). "Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise." Crit Rev Oncol Hematol **54**(1): 11-29.
- Sugahara, K. N., T. Hirata, et al. (2006). "Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments." J Biol Chem **281**(9): 5861-8.
- Szollosi, J., L. Tron, et al. (1984). "Fluorescence energy transfer measurements on cell surfaces: a critical comparison of steady-state fluorimetric and flow cytometric methods." Cytometry **5**(2): 210-6.
- Tammi, R., K. Rilla, et al. (2001). "Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism." J Biol Chem **276**(37): 35111-22.
- Tang, C. K., X. Z. Concepcion, et al. (1999). "Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo." Cancer Res **59**(20): 5315-22.
- Tanner, M., A. I. Kapanen, et al. (2004). "Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer." Mol Cancer Ther **3**(12): 1585-92.
- Thomas, L., T. Etoh, et al. (1993). "Migration of human melanoma cells on hyaluronate is related to CD44 expression." J Invest Dermatol **100**(2): 115-20.
- Thorne, R. F., J. W. Legg, et al. (2004). "The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events." J Cell Sci **117**(Pt 3): 373-80.
- Toole, B. P., T. N. Wight, et al. (2002). "Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease." J Biol Chem **277**(7): 4593-6.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." Mol Cell Biol **16**(10): 5276-87.
- Wang, Q., G. Villeneuve, et al. (2005). "Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation." EMBO Rep **6**(10): 942-8.
- Wang, S. J. and L. Y. Bourguignon (2006). "Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **132**(7): 771-8.
- Wiley, H. S. (2003). "Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling." Exp Cell Res **284**(1): 78-88.
- Worthylake, R., L. K. Opresko, et al. (1999). "ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors." J Biol Chem **274**(13): 8865-74.
- Yakes, F. M., W. Chinratanalab, et al. (2002). "Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action." Cancer Res **62**(14): 4132-41.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.
- Yoshihara, S., A. Kon, et al. (2005). "A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells." FEBS Lett **579**(12): 2722-6.

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. 2423-33. **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**

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 Sebestyen, **Z Krekk**, Peter Nagy, The role of HER-2 oncogene in the metastasis of breast tumors. *Cytometry* 2001 46, 199-120.
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, Markku Tammi, Szöllősi János Az ErbB és CD44 receptorok sejtfelszíni asszociációjának vizsgálata hialuonsav-kezelt tumoros sejtvonalakon. Magyar Biofizikai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2005. (poszter)
7. **Pályi Krekk Zsuzsanna**, Horváth Gábor, Fazekas Zsolt, Sirpa Jalkanen, Vereb György, Markku Tammi, 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, Markku Tammi, Szöllősi János ErbB és CD44 receptorok sejtfelszíni eloszlásának változása hialuronsav kezelés hatására. Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2004. (poszter)
10. Zs. Sebestyén, 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. Sebestyén, **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. Sebestyén, **Zs Krekk**, P. Nagy, Gy. Vereb, L. Balogh, M. Barok, H. Bardos, S. Damjanovich, J Szollosi. Heteroasszociációja erbB molekuláinak emlőrákos sejtvonalakon. Hungarian Cell Analysis Conference, Budapest, 2000. (poszter)

9. TÁRGYSZAVAK

Emlőtumor, ErbB2, Herceptin/trastuzumab, trastuzumab rezisztencia, maszkolás, SCID egér, EGFR, pertuzumab, CD44, hialuronsav, CD44 shedding

Breast cancer, ErbB2, Herceptin/trastuzumab, trastuzumab-resistance, masking, SCID mouse, EGFR, pertuzumab, CD44, hialuronan, CD44 shedding

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőim Prof Szöllösi János és Dr. Nagy Péter témavezetését és munkám során nyújtott elengedhetetlen segítségét. Köszönöm Dr. Vereb György, Barok Márk, Fazekas Zsolt, Horváth Gábor és Petrás Miklós munkám során nyújtott segítségét. Köszönet a kollegális legkörért Friedländer Elza, Fábián Ákos, Tóth Enikő, Juhász Judit valamint a munkacsoportunk valamennyi jelenlegi és korábbi tagjának. Köszönöm Óry Gabriella, Pálné Terdik Tünde, Vágóné Toldi Hajnalka technikai közreműködését valamint a Biofizikai és Sejtbiológia Intézet valamennyi dolgozójának segítségét. Köszönöm férjem ifj. Pályi Zoltán és tágabb családom kitartó szeretetét, támogatását és türelmét.

NON SOLUS...

**11. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények
különlenyomatai**