

**AZ ANTITESTFÜGGŐ SEJTKÖZVETÍTETT
CITOTOXICITÁS (ADCC) SZEREPE A
TRASTUZUMAB HATÁSMECHANIZMUSÁBAN**

BAROK MÁRK



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

DEBRECEN, 2007.

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Az epidermális növekedési faktor receptor család	6
2.2. Az ErbB család tagjainak fiziológiás jelentősége	7
2.3. Mit tudunk az ErbB család jelátviteli folyamatáról?	7
<u>2.3.1. A ligand</u>	8
<u>2.3.2. Az ErbB fehérjék kölcsönhatásai egymással, kommunikáció az ErbB családon belül</u>	9
2.3.2.1. Heterodimerizáció	9
2.3.2.2. Homodimerizáció	11
<u>2.3.3. Az ErbB receptorok intracelluláris részéhez kapcsolódó fehérjék</u>	11
2.4. Az ErbB2 szerepe mellrákokban	12
2.5. Az ErbB2 ellenes antitestterápia, a trastuzumab	13
<u>2.5.1. Hogyan hat a trastuzumab?</u>	14
2.5.1.1. Az Fab vagy az Fc rész a fontosabb?	15
<u>2.5.2. Trastuzumab-rezisztencia</u>	16
2.5.2.1. A JIMT-1 sejtvonal	18
2.6. Az áttétképződésről, röviden	19
<u>2.6.1. A trastuzumab kezelés hatása a vérben keringő daganatos sejtekre (VKDS) és a mikrometasztázisokra</u>	20
3. Célkitűzések	21
4. Anyagok és módszerek	22
4.1. Sejtek	22
4.2. AI-sejtvonalak alapítása JIMT-1 xenograftokból	22
4.3. SCID és nude egerek	23
4.4. Az egerek oltása daganatos sejtekkel, az egerek kezelése, a xenograftok nagyságának becslése	23
4.5. Az egerek véreztetése, a xenograft kivétele, csontvelővétel	24
4.6. Mononukleáris sejtek szeparálása vérből és csontvelőből	24

4.7. Immunhisztokémia, immuncitokémia	24
4.8. Antitestek	25
4.9. Fab fragmentumok preparálása	26
4.10. Trastuzumab-F(ab') ₂ fragmentumok preparálása	26
4.11. Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszcens festékekkel	27
4.12. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)	27
4.13. Fluoreszcens mikroszkópia	29
4.14. Konfokális mikroszkópia	29
4.15. Az ADCC <i>in vitro</i> vizsgálata	29
4.17. Az <i>in vitro</i> trastuzumb-érzékenység vizsgálata	30
4.18. A konfokális mikroszkóppal felvett képek elemzése	31
4.19. Statisztika	31
5. Eredmények és megbeszélésük	32
5.1. Korai trastuzumab kezelés hatása a JIMT-1 xenograftokra	32
5.2. A trastuzumab kezelés hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre	33
5.3. A trastuzumab-F(ab') ₂ tesztelése	36
5.4. A trastuzumab-F(ab') ₂ kezelés hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre	40
5.5. „Al-sejtvonalak” alapítása a JIMT-1 xenograftokból	41
5.6. In vitro ADCC vizsgálata trastuzumab érzékeny és rezisztens sejtvonalokon	41
5.7. Érzékenyek-e a JIMT-1 X+ sejtek trastuzumab-kezelésre <i>in vivo</i> ?	42
5.8. A trastuzumab és a trastuzumab-F(ab') ₂ kezelés is csökkentette az ErbB2 expressziót a JIMT-1 xenograftokon	44
5.9. A trastuzumab-kezelés leállítása után 6 héttel trastuzumab a sejteken?	46
5.10. Vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) kimutatása JIMT-1 sejtekkel oltott SCID egerekben	47
5.11. A trastuzumab hatása a vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) és csontvelői, disszeminált daganatsejtek (CSDDS) számára	49
<u>5.11.1. A trastuzumab és a rituximab hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre</u>	<u>49</u>
<u>5.11.2. A trastuzumab és a rituximab hatása a vérben keringő daganatos sejtek (VKDS) és a csontvelői, disszeminált daganatsejtek (CSDDS) számára</u>	<u>50</u>
6. Összefoglalás	56
7. Köszönöm	58

8. Irodalomjegyzék	59
9. Közlemények	68
10. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	71

„Úgyse hiszi senki el magának,
Hogy amit lát, az tényleg van,
Hanem várja, hogy a valódi látványt
Jelző kürtszó felharsan.

Szól a kürt, ellibben a függöny,
Amit most látsz, az tényleg van.
Kár, hogy mikor körbenéznél,
A szélben a mécsesed ellobban.”

Kispál és a Borz^a

^a Tudom, hogy amikor Lovasi András papírra vetette, majd elénekelte ezeket a sorokat, nem a kutatásra gondolt. Engem mégis a kutatómunkám hektikusságára, az általam tapasztalt és feltételezett dolgokról gondolt higgyem? – ne higgyem?, úgy van! – nem úgy van? folytonos váltakozására, a kételyre emlékeztet a vers.

1. BEVEZETÉS

A mellrák az egyik leggyakrabban előforduló daganatos megbetegedés. Annak ellenére, hogy az utóbbi 30 évben jelentős előrelépések történtek a szűrésében és a kezelésében, ez a betegség évente fél millió ember haláláért felelős világszerte [1]. A mellrákkal diagnosztizált betegek körülbelül felénél áttétes betegség fejlődik ki. Az áttétes mellrák kezelése palliatív, a betegség kiújulása esetén az átlagosan várható élettartam 24 és 30 hónap között van [2].

Dennis Slamon és mksai 1987-es és 1989-es tanulmányaikban megmutatták, hogy a mellrákok mintegy 30%-ában a ráksejtek fokozottan fejeznek ki egy ErbB2 nevű fehérjét. A tanulmányok összefüggést találtak a gén amplifikációja ill. a fehérje fokozott kifejeződése és a mellrákos betegek túlélése között [3; 4].

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

2. Irodalmi áttekintés^b

A növekedési faktorok sejtfelszíni receptoraikhoz kapcsolódása nem ritkán meglehetősen összetett folyamatokat indít el, amelyek fontosak a sejtek működésének szabályozásában. A jelátvitelben fontos szerepük van a transzmembrán receptor tirozin kinázoknak. Ennek a csoportnak egyik képviselője az epidermális növekedési faktor receptor család, amelynek nemcsak a fiziológiás jelátvitelben, hanem a rosszindulatú daganatok keletkezésében és növekedésében is jelentős a szerepe. Az I. osztályú tirozin kinázok közé tartozó családnak négy tagja van: az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR vagy ErbB1), az ErbB2, az ErbB3 és az ErbB4. Az ErbB család leírásának történetében több olyan felfedezés született, amelyek nagy jelentőségűek voltak a biológiában.

Az epidermális növekedési faktort (EGF) Cohen fedezte fel 1962-ben [5]. Receptora, az EGFR volt az első sejtfelszíni receptor, amit közvetlenül kapcsolatba hoztak a rákkal [6]. 1980-ban kiderült, hogy az EGFR egy ligand-függő tirozin kináz [7]; ez forradalmi felfedezés volt a növekedési faktorok biológiájában. A daganatbiológia hasonló jelentőségű felfedezése volt az, hogy az avian erythroblastosis vírusból származó v-erbB onkogén nem más, mint az EGFR csonkított formája^c [8; 9]. Ezután találták meg analógját az emberi genomban [10]. 1984-ben karcinogénnel kezelt patkányokban kifejlődött *neuro/glioblasztómában* felfedeztek egy onkogént, aminek először a *neu* nevet adták [11]. A *neu* nagyon hasonlított a virális v-erbB-hez, terméke pedig az epidermális növekedési faktor receptorhoz; az onkogén az ErbB2 nevet kapta. Az ErbB3 és az ErbB4 felfedezését a humán genomban célzott keresés előzte meg [12; 13].

2.1. Az epidermális növekedési faktor receptor család

A négy receptor szerkezete és funkciója igen hasonló: az extracelluláris rész négy doménből áll, kettő ciszteinben gazdag; a juxtamembrán és a transzmembrán rész a receptor modifikációjában és aktivációjában játszik fontos szerepet; a tirozin kináz domén intracellulárisan helyezkedik el, és sok foszforilálható aminosavat tartalmaz, melyek a

^b Dolgozatom „Irodalmi áttekintés” című fejezetében felhasználtam részeket a 2001-ben írt „Az ErbB2 és ErbB3 fehérjék szupramolekuláris szerveződése emlőtumor sejteken” című TDK pályamunkámból.

^c Az ErbB onkogén család neve ma is őrzi az elsődleges felfedezési helyet, *erb*: avian erythroblastosis virus.

receptorfunkciót és a jelátviteli útvonalat befolyásolják, sejten belüli hírvivő fehérjéket toboroznak [14; 15; 16].

2.2. Az ErbB család tagjainak fiziológiás jelentősége

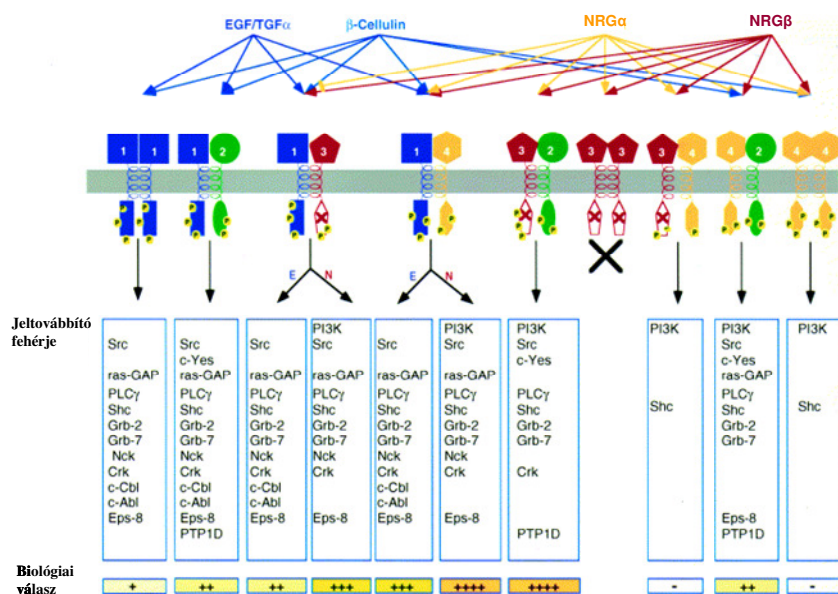
A család tagjainak szerepét leírták a szívfejlődésben, a központi és a perifériás idegrendszer fejlődésében, az epitéliális szövetek fejlődésében, a szöveti megújulásban, a sebgyógyulásban, az angiogenezisben [17; 18; 19; 20; 21; 22; 23]. Leírták, hogy míg az ErbB1 és az ErbB2 mezenhimális szövetekben is kifejeződik, addig az ErbB3 és az ErbB4 expressziója inkább csak az epitéliális sejtekre jellemző, viszont ligandjaik nagy részét mezenhimális sejtek termelik. Ez arra utalhat, hogy az ErbB receptor családnak szerepe lehet a mezenhimo-epitéliális kölcsönhatásban [24]. Az ErbB2 expressziója a magzati fejlődés során magas szintű, felnőttekben alacsony szintje mutatható ki epitel sejteken és több normális szövetben.

2.3. Mit tudunk az ErbB család jelátviteli folyamatáról?^d

Az ErbB fehérjék jelátviteli folyamatát három nagy szakaszra lehet bontani: először az ErbB receptorhoz extracellulárisan ligand kötődődik, majd a receptorok egymással „kommunikálnak”, azután az ErbB intracelluláris részéhez intracelluláris hírvivő molekula kapcsolódik. A folyamatot az 1. és a 2. ábra szemlélteti.

^d Ezt a fejezetet Yarden, Citri és Alroy összefoglaló közleményei alapján írtam [14; 16; 29], a folyamatokat szemléltető 1. ábrát Alroy közleményéből ollóztam [29]. A 2. ábrát Gamett közleménye alapján készítettem [25].

1. ábra. Jelátvitel az ErbB család tagjain keresztül



I. Alroy, Y. Yarden/FEBS Letters 410 (1997) 83–86

2.3.1. A ligand

Az ErbB receptor család ligandjai, amelyek a sejtek működését auto-, para- és endokrin úton szabályozzák, lehetnek membránba integrált fehérjék, valamint proteolitikus hasítást követően a plazmában jelenlévő molekulák. Ma három családba sorolják őket:

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

Az ErbB2-nek nem ismert fiziológiás ligandja.

2.3.2. Az ErbB fehérjék kölcsönhatásai egymással, kommunikáció az ErbB családon belül

A receptorok közül kettőnek, az ErbB1-nek és az ErbB4-nek, van ligand stimulált tirozin kináz aktivitása. Az ErbB2-nek nem ismert fiziológiás ligandja, az ErbB3-nak pedig nincs

tirozín kináz aktivitása a kináz doménben lévő aminosav szubsztitúció miatt. Az ErbB2-nek és az ErbB3-nak ahhoz, hogy részt vehessenek a jelátvitelben, egy másik molekulához kell kapcsolódniuk, így egymás potenciális párjai lehetnek egy működőképes dimerben, melyben az extracelluláris szignál az ErbB3 „veszi fel”, és az ErbB2 intracelluláris tirozín kináza továbbítja. A ligand kötődése az ErbB molekulákhoz egy dimerizációs kaszkádot indít el, mely összetett szignálaktivitásokat és különböző biológiai válaszokat kezdeményez az ErbB család által.

A kölcsönhatás formái:

2.3.2.1. Heterodimerizáció

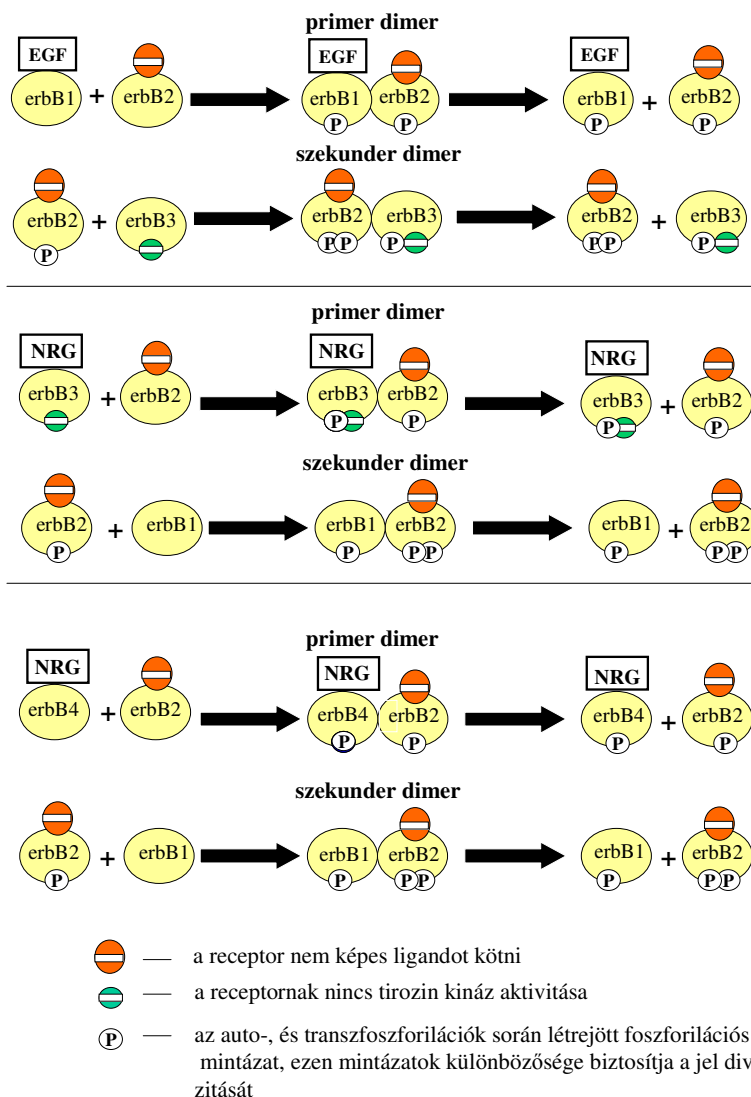
Az **ErbB1** EGF kötés után a ligandkötésre képtelen ErbB2-vel egy nagy tirozín kináz aktivitású primer dimert képez. A dimer tagjai egymást foszforilálják, intracelluláris szignálutakat indítanak el, majd szétválnak, és az ErbB2 a tirozínkináz hiányos ErbB3-mal szekunder dimert képez. A szekunder dimerben az ErbB2 foszforilálja önmagát és az ErbB3-at, újabb szignálutakat indítva el. Az **ErbB3** a NRG kötése után primer dimert képez az ErbB2-vel, a dimer molekuláit foszforilálja az ErbB2 tirozín kináza, szignálutakat indítanak el, majd szétválnak, és az ErbB2 az ErbB1-gyel szekunder dimert képez. A dimer tagjai egymást foszforilálják, és az előbbiektől eltérő szignálutak indulnak el. Az **ErbB4** az ErbB3-hoz hasonlóan NRG kötés után előbb az ErbB2-vel képez primer dimert, majd az ErbB1-gyel szekunder dimert. A képződött három primer dimer auto-, és transzfoszforilációk során létrejött foszforilációs mintázata egymástól különböző, hasonlóképpen különbözik egymástól a három szekunder dimer foszforilációs mintázata is, így más intracelluláris hírvivőhöz kapcsolódhatnak, ezzel növelve a jel diverzitását. Az ErbB családon belüli heterodimerképződést az 2. ábra mutatja (az ábrát Gamett közleménye alapján készítettem [25]).

Az ErbB3 homodimer affinitása alacsonyabb a NRG-hoz mint az ErbB4 homodimeré [26]. Amikor viszont az ErbB2-vel képeznek heterodimert, az a dimer kapcsolódik nagyobb affinitással a NRG-hoz, amelyiknek az ErbB3 tagja. A kapcsolat az ErbB2-vel tehát megváltoztatja az ErbB3 és az ErbB4 relatív affinitását a NRG-hoz. Leírtak még ErbB1-ErbB3 és ErbB1-ErbB4 heterodimereket, amelyek csak akkor jönnek létre, ha nincs a sejten ErbB2, de ezek az asszociációk ekkor is csak kis mértékűek.

Az ErbB2-nek központi szerepe van a heterodimerek képződésében, a másik három receptor egymással versengve kapcsolódik az ErbB2-höz. A dimerek közül azok a

stabilabbak, melyeknek az ErbB2 tagja, ekkor fokozódik a dimer tirozin kináz aktivitása, és nő a ligand iránti affinitása.

2. ábra. Heterodimerek képződése az ErbB családon belül



2.3.2.2. Homodimerizáció

Fent említettem, hogy az ErbB3 és az ErbB4 homodimer NRG affinitása alacsony, ráadásul az ErbB3-nak nincs tirozin kináz aktivitása. ErbB1 homodimer is ismert, EGF kezelés után gyors down-regulációt mutat. Ezen homodimerek biológiai szerepe még nem teljesen tisztázott. ErbB2 homodimer kétféleképpen jöhet létre: Pontmutáció által, amely a transzmembrán régióban okoz aminosavcserét; ezt patkány nitrozourea-ával indukált

neuroblasztómájában igazolták [27]. Emberi daganatokban ehhez hasonló mutációt eddig nem találtak, ezért itt spontán dimerizációról lehet szó, mely a nagy receptorsűrűség miatt jöhet létre [28]. Elmondható, hogy ha a sejten van ErbB2, akkor az ErbB1-, ErbB3-, ErbB4-homodimerek kis mennyiségben képződnek, mindhárom fehérje elsődleges dimerizációs partnere az ErbB2 [29].

2.3.3. Az ErbB receptorok intracelluláris részéhez kapcsolódó fehérjék

A ligand kötése dimerizációt vált ki, a dimert alkotó ErbB fehérjék transzfoszforilálják egymás intracelluláris doménjeit, így SH2, SH3 és PTB doménnal rendelkező fehérjék (pl. Shc, Grb2, p85, clb) kapcsolódhatnak hozzájuk. Az, hogy a foszforiláció hol történik, pontosan melyik tirozin foszforilálódik, függ a dimerizációs partnertől, és hogy primer, vagy szekunder dimer-e az adott komplex. Mivel a kapcsolódó jeltovábbító fehérjék meghatározott foszfortirozin mintázatot ismernek fel, az ErbB molekulák kölcsönhatásai során létrejött foszfortirozin mintázatok meghatározzák a további intracelluláris eseményeket.

A növekedési szignál sokféle információt hordozhat a sejt számára. Az ErbB család rendszere lehetővé teszi a jel erősítését és divergálását, vagyis azt, hogy az extracelluláris tér molekulái által hordozott információ a jelátvitel során különbözőképpen fordítódjon le, eltérő minőségű és erősségű sejtválaszokat eredményezve.

2.4. Az ErbB2 szerepe mellrákokban

Bár az ErbB2 amplifikációját számos daganatban kimutatták [30], úgy tűnik, hogy legfontosabb szerepe a mellrák növekedésének szabályozásában van. Míg az emlő nem malignus epitelsejtein 20 000 – 50 000 darab ErbB2 receptor van, a mellráksejteken akár 2 millió is lehet^e. Ennek az esetek túlnyomó részében az ErbB2 gén amplifikációja az oka [4]. Az ErbB2 fokozott expressziója összefügg a daganat magas szövettani grádussal, a ráksejtek magas mitotikus aktivitásával, a p53 gén mutációjával, a daganat negatív ösztrogén receptor státusával. Ha a beteg daganata ErbB2 pozitív^f, betegségének rosszabb a prognózisa, mint az

^e Az ErbB2 receptorok hozzávetőleges száma az általunk vizsgált mellrák-sejteken: JIMT-1: 300 000; SKBR3: 800 000; BT474: 1 millió.

^f Két, többé-kevésbé egyenrangúnak tartott módszert használnak rutinszerűen a daganatok ErbB2 pozitivitásának vizsgálatára: a fehérje fokozott kifejeződését kimutató immunhisztokémiát és a gén amplifikációját kimutató fluoreszcencia in situ hibridizációt [2].

ErbB2 negatív betegeké: valószínűbbek az áttétek és rövidebb a relapszusmentes túlélés [3; 4; 31; 32].

A daganatos sejtek növekedését gyakran fokozottan kifejeződő onkogének irányítják, ezért még előrehaladott daganatos betegség esetén is sikeres lehet olyan terápia alkalmazása, amellyel a fokozottan kifejeződő onkoproteint célozzák meg [33; 34]. Az ErbB2-nek központi szerepe van az ErbB receptor család általi jelátvitelben, így a funkciójának blokkolása jelentősen csökkentheti a daganatsejtek növekedését.

Az ErbB2 gátlása az alábbi módokon lehetséges:

1. Az ErbB2 tirozin kináz aktivitásának gátlása kináz inhibitorokkal [35].
2. Az ErbB2 fehérje termelésének gátlása anti-sense oligonukleotidokkal [36], vagy siRNS-sel [37].
3. Az ErbB2 mRNS-ének hasítása ribozimmal [38].
4. ErbB2-ellenes antitestekkel (lásd alább).
5. Toxinok kapcsolása ErbB2 ellenes antitestekhez (immunotoxin) [39].
6. Immunizálás ErbB2 peptidekkel [40].

2.5. Az ErbB2 ellenes antitestterápia, a trastuzumab

Az a felfedezés, hogy egyes ErbB2 ellenes antitestek képesek gátolni az ErbB2-t fokozottan kifejező ráksejtek növekedését, áttörést jelentett a daganat-terápiában [41]. A 4D5 nevű, ErbB2 ellen egérben termeltetett antitestről kiderült, hogy *in vitro* és állatkísérletekben *in vivo* is gátolja az ErbB2-t fokozottan kifejező ráksejtek növekedését. A 4D5-tel kezelt betegek egy része válaszolt a kezelésre, azonban immunválasz fejlődött ki bennük az egér immunglobulin ellen, ami az antitestet a terápiában használhatatlanná tette [42]. Hogy ezt a mellékhatást elkerüljék, antitest-humanizációs technikával az egér 4D5 antitestből kifejlesztettek egy csupán ~ 5% egér eredetű humanizált antitestet, a trastuzumabot. Az új antitest specifikusabban és nagyobb affinitással kötődött az ErbB2-höz, és jóval kevésbé volt immunogén [43]. *In vitro* és *in vivo* preklinikai vizsgálatokban bizonyították, hogy a trastuzumab megőrizte a 4D5 daganatgátló hatását [44], és képes volt *in vitro* ADCC-t kiváltani ErbB2-t fokozottan kifejező emlőráksejteken [45]. II-es és III-as klinikai fázisban egyértelműen bebizonyosodott a trastuzumab daganatellenes hatása mind monoterápia formájában, mind kemoterápiával kombinálva [46; 47].

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

- monoterápia formájában, olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg már legalább 2 kemoterápiás szerrel kezeltek.
- kombinálva paclitaxellel olyan áttétes, ErbB2 pozitív mellrákos betegek kezelésére, akiket előzőleg még nem kezeltek kemoterápiás szerrel.
- 2006 novemberében, miután széleskörű klinikai vizsgálat sorozatban 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 [48].

2.5.1. Hogyan hat a trastuzumab? [49; 50]^h

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

In vitro kísérletekben bizonyították, hogy a trastuzumab:

- bivalens antitestként keresztüköt két ErbB2 receptort, olyan jelátviteli utakat indítva ezzel el, amelyek egyik végeredménye az ErbB2 internalizációja és degradációja: a sejtfelszíni ErbB2 mennyiség csökkenéseⁱ [51],

^g Forrás: www.genentech.com

^h Ezt a fejezetet Nahta két összefoglaló közlemény alapján írtam.

ⁱ Régebben a trastuzumab ErbB2-t csökkentő hatását tartották a trastuzumab daganatgátló hatásáért leginkább felelősnek; jelen dolgozatban megpróbálkozom azzal, hogy szétválasszam a trastuzumab ErbB2-t csökkentő és a daganatgátló hatását (lásd 43. oldalt).

- gátolja a mitogén aktivált protein kináz és a foszfatidil-inozitol-3 kináz szignalizációs útvonalakat [52; 53],
- csökkenti a ciklin D1 expresszióját, ezáltal csökken a ciklin-dependens kináz inhibitor p27^{kip1} szint: a sejtciklus leáll a G1 fázisban [54],
- apoptózist vált ki [51],
- növeli az ErbB2 HLA-I-hez kapcsolódó antigénprezentációjának mértékét [55].

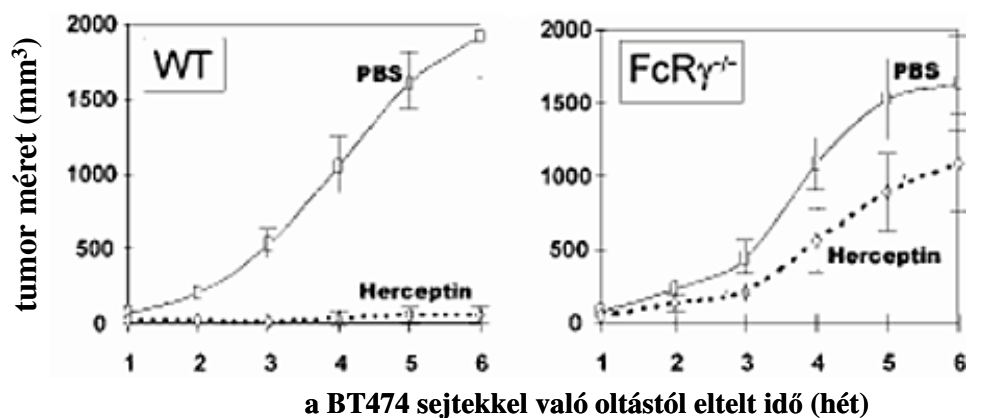
In vivo trastuzumab-kezelés emlőrák-xenograftokban csökkentette a kis erek számát és átmérőjét, aminek háttérében 4 érképződést segítő növekedési faktor expressziójának csökkenését (VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), angiopoietin-1, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)), és az érképződést gátló TSP-1 (thrombospondin-1) szintjének növekedését találták [56].

2.5.1.1. Az Fab vagy az Fc rész a fontosabb?

Természetesen a trastuzumab Fab része elengedhetetlen ahhoz, hogy az antitest az ErbB2-höz kapcsolódjon. De vajon mekkora rész jut a trastuzumab daganatgátló hatásából az Fab és mekkora az Fc részén keresztül kifejtett hatásnak? Egyszerűsítve azt is kérdezhajjuk, hogy a hatás hányad részéért felelős a trastuzumab ErbB2-n keresztül, a rákos sejtre közvetlenül kifejtett hatása, és mekkora hányadért felelős az ADCC (és a CDC).

A kérdés eldöntésére Clynes és munkacsoportja két kulcsfontosságú kísérletet végzett. BT474, *in vitro* trastuzumabra érzékeny mellráksejteket oltottak ép Fc γ R-ral és Fc γ R-defektussal rendelkező immunhiányos egerekbe (3. ábra; WT: ép Fc γ R; Fc γ R-/-: Fc γ R-defektus; Herceptin = trastuzumab). Az egereket hetente kezelték trastuzumabbal. Az ép Fc γ R-ral rendelkező egerekben a trastuzumab meggátolta a daganatnövekedést, az Fc γ R-defektussal rendelkező egerekben viszont a növekedésgátló hatásának mintegy 2/3-át elveszítette. (Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a 3. ábrán bemutatott kísérlettel párhuzamosan elvégezték ugyanezt a kísérletet, azzal a módosítással, hogy trastuzumab helyett a humanizálatlan, egér 4D5-tel kezelték az egereket: a 4D5-nek ugyanolyan volt a hatása, mint a humanizált trastuzumabnak. Mindez bizonyítja, hogy egér-modell rendszerben

3. ábra. Az Fc γ receptorok szerepe a trastuzumab hatásmechanizmusában I.



Clynes, Nature Medicine 2000.

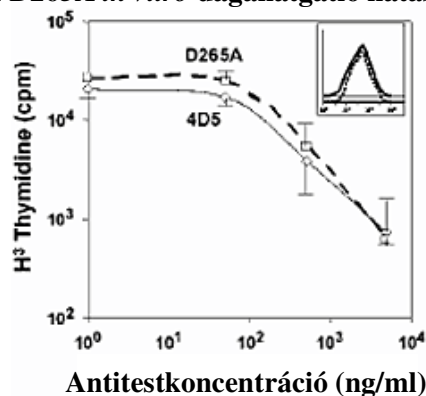
a trastuzumab és a 4D5 ugyanolyan jól működik, annak ellenére, hogy az egyiknek humán, a másiknak egér Fc része van). Ezután a 4D5 antitestből Fc részének egyetlen aminosavának cseréjével egy Fc γ R-hoz kötödni képtelen antitestet hoztak létre (D265A), amely megőrizte *in vitro* daganatgátló képességét (4. ábra bal része), de *in vivo* hatásának jó részét elveszítette (4. ábra jobb oldali része) [57].

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

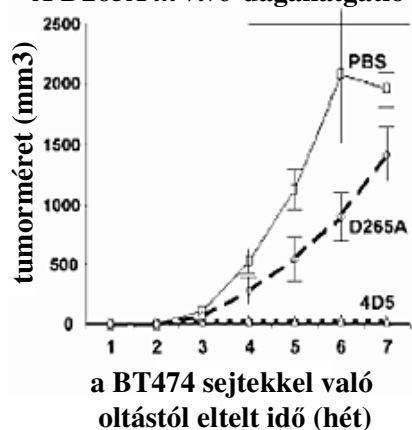
Fontos megismételnem, hogy ezeket a kísérleteket egy olyan mellrák sejtvonallal (BT474) végezték, amelynek a növekedését a trastuzumab *in vitro* gátolta.

4. ábra. Az Fcγ receptorok szerepe a trastuzumab hatásmechanizmusában II.

A D265A *in vitro* daganatgátló hatása



A D265A *in vivo* daganatgátló hatása



Clynes, Nature Medicine, vol.6, 2000.

2.5.2. *Trastuzumab-rezisztencia*^j

A meggyőző klinikai eredmények ellenére sajnos jónéhány ErbB2 pozitív mellrák elsődlegesen rezisztens (primer rezisztencia) a trastuzumab-terápiára, az esetek nagy részében pedig körülbelül 1 éves trastuzumab-kezelés után ellenállóvá válnak a daganatok a kezelésre (szerzett rezisztencia) [46; 58].

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 [59].
 - Az inzulin-szerű növekedési faktor receptor útvonalának aktiválódása [60].
 - Akt útvonal aktiválódása [61].
 - A MUC4 nevű sejtfelszíni szialomucin [62; 63], vagy a hialuronsav [64] eltakarhatja az ErbB2 trastuzumab kötő epitópját a trastuzumab elől.
2. A PTEN tumorsuppresszor csökkent expressziója [65].
3. Hiba az ADCC-ben: lásd alább.

^j Ezt a fejezetet is Nahta két összefoglaló közlemény alapján írtam [49; 50]

Jóllehet Clynes és munkacsoportja fent részletezett kísérlete világossá tette, hogy a trastuzumab hatásának nagyobb részéért az ADCC felel, mégis csak kevés közlemény foglalkozik azzal, hogy mi lehet a szerepe/jelentősége az ADCC-nek a trastuzumab-rezisztenciában. Mimura és mksai kísérletükben azt a nyelőcsőrák sejtvonalat, amely *in vitro* TGF- β -t (transforming growth factor- β) termelt, ErbB2 pozitivitása ellenére jóval kisebb mértékben tudták az NK sejtek trastuzumab-közvetítette sejtölésével megölni, mint az ErbB2-t hasonló mértékben kifejező, de TGF- β -t nem termelő sejteket. Ha az ellenálló sejteket TGF- β -t semlegesítő antitesttel kezelték, érzékennyé váltak a trastuzumab-közvetítette sejtölésre [66]. Kono és mksai előrehaladott gyomorrákos betegekből izolált NK sejtek (NK_{beteg}) trastuzumab-közvetítette sejtölő képességét vizsgálták *in vitro*. A kontroll NK sejtekhez (NK_{kontroll}) képest az NK_{beteg} sejtek sokkal kisebb mértékű ADCC-t váltottak ki. Ezzel párhuzamosan megfigyelték, hogy az NK_{beteg} sejteken alacsonyabb az ADCC-ben kulcsfontosságú CD16 ζ alegységének expressziós szintje. *In vitro* interleukin-2 kezeléssel növelni tudták az NK_{beteg} sejtek CD16 ζ expresszióját, a megnövelt CD16 ζ expressziójú sejtek pedig az NK_{kontroll} sejtekhez hasonló mértékű trastuzumab-közvetítette sejtölésre voltak képesek [67].

2.5.2.1. A JIMT-1 sejtvonal

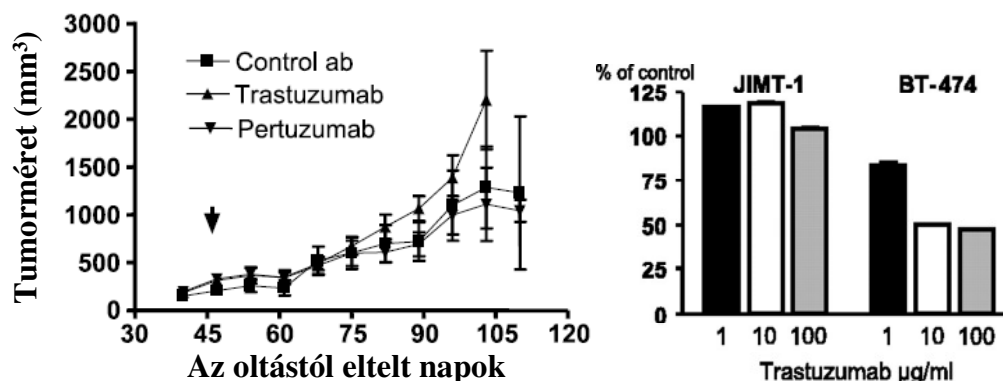
Ha egy jelenséget alaposan meg akarunk vizsgálni, a vizsgálathoz elengedhetetlenül szükséges modellek, modell-rendszerek létrehozása. Minél több a megfelelő modellünk, annál sokrétűbben tanulmányozhatjuk a jelenséget. Különösen igaz ez akkor, ha olyan jelenséggel van dolgunk, amelynek minden valószínűség szerint sok, egymástól gyakran független kiváltó oka van. Mint a trastuzumab-rezisztenciának.

Az irodalomban és a sejtbankokban megtalálható ErbB2 pozitív mellrák sejtvonalak mindegyike érzékeny a trastuzumabra *in vitro*. Ugyan az ezekből a sejtvonalakból *in vitro* előállított trastuzumab-rezisztens al-sejtvonalak [68] vizsgálatával is jelentős eredményeket kaphatunk, mégis nagyon fontosnak tartom, hogy 2004-ben egy trastuzumab kezelésre klinikailag rezisztens, 62 éves, ErbB2 pozitív mellrákos nőbeteg mellüregi, daganatos folyadékgyüleméből izolálta Jorma Isola^k és Minna Tanner a JIMT-1 sejtvonalat [69]. Annak

^k Nomen est omen.

ellenére, hogy a JIMT-1 sejtekben az ErbB2 gén amplifikálódott és a sejteken mintegy 300 000 darab ErbB2 receptor van, a JIMT-1 sejtek *in vitro* és *in vivo* állatkísérletben egyaránt trastuzumab-rezisztensnek bizonyultak (5. ábra.)

5. ábra. A JIMT-1 sejtek *in vivo* és *in vitro* is rezisztensek trastuzumabra



Tanner M., Molecular Cancer Therapeutics, 2004.

2.6. Az áttétképződésről, röviden

A legtöbb daganatos beteg halálát a primer daganatból leváló daganatsejtekből távoli szervekben képződött áttétek okozzák. Az áttétképződésben központi szerepük van a vérben keringő daganatos sejteknek, a disszeminálódott daganatsejteknek és a többsejtes daganatsejt-aggregátumoknak, mert minden áttét ezekből fejlődik ki; jóllehet egy igen kevésbé hatékony folyamatban.

1 grammnyi primer daganatszövetből naponta körülbelül 10^6 darab daganatsejt válik le és kerül a vér/nyirokkeringésbe [70]. Az intravazáció általában a daganat mozaikos falú erein keresztül történik, amelyeknek a falát endotél- és tumorsejtek együtt alkotják. Chang és mksai számításai szerint naponta az ér lumenével érintkező daganatsejtek mintegy fele szakad le [71] és válik *vérben keringő daganatos sejt* (*VKDS*). Habár rendkívül nagy mennyiségű daganatsejt jut a keringésbe, csak elenyésző hányadukból lesz áttét: Luzzi és mksai számításai szerint a VKDS-ek csak mintegy 0.02 %-ából lesz metasztázis [72]. A legtöbb VKDS elpusztul a keringésben az immunrendszer támadása [73; 74], a

hemodinamikai erők [75], vagy a sejt-sejt és a sejt-mátrix kapcsolatok elvesztésének következtében kiváltott apoptózis¹ [76] által. Néhány VKDS kilép a keringésből és távoli szövetekben *disszeminált daganatsejtként (DDS)* akár évekig is meghúzódhat. A VKDS-ek és a DDS-ek a sejtciklus G₀ fázisában lévő, nem osztódó sejtek, ezért a legtöbb kemoterápiás szer nem hat rájuk [77; 78; 79]. A keringésből kilépett VKDS-ek mintegy 2 %-a kezd osztódni és képez *mikrometasztázist*. Még kisebb hányadukból (0.02 %) lesz valódi *metasztázis* [76; 79].

Habár nagyon kevés keringő és a disszeminált daganatsejt fejlődik metasztázissá, mivel a mellrákok átlagos átmérője a diagnózis pillanatában 2-3 cm (lásd mammográfia tanulmányok [80; 81]), a diagnózisig ill. a terápia megkezdéséig óriási számú tumorsejt juthat a keringésbe. Az áttétes emlőrákos betegek 60 %-ában találtak legalább 2 VKDS-et, 49 % vérében 5-nél több és 21 % vérében 50-nél is több volt (7,5 ml vérmintában vizsgálva). Azoknak az I-III stádiumú mellrákbetegeknek, akiknek a csontvelőjében mikrometasztázisokat találtak (30 %), magasabb grádusú primer daganatuk és több nyirokcsomó-áttétjük volt. A VKDS-ek, a DDS-ek és a mikrometasztázisok jelenléte mind primer, mind áttétes mellrákos betegeknél összefügg a betegség rossz prognózisával [82; 83; 84; 85].

A primer daganatból nem csak egysejtes formában szakadnak le sejtek: *keringő, többsejtes daganatsejt-aggregátumoknak (KTDA)* nevezzük a primer daganatból együtt, egymással kapcsolódva leszakadt daganatsejt-kupacot, amelyben a sejtek együtt érik el a keringést és együtt vándorolnak [86]. Az együttes vándorlásnak számos előnye van: a sejtakupac által termelt növekedést/migrációt segítő faktorok magas lokális koncentrációja autokrin/parakrin úton hat a sejtekre; a kupac középpontjában lévő sejtek védettebbek az immunrendszer támadásai és a érrendszerben fellépő nyíróerőkkel szemben; a KTDA-ok a kapillárisokban fennakadnak, sejteik osztódni kezdenek, a kapilláris elpattan és a daganatsejt-kupac metasztázissá fejlődik. A KTDA-ok jelenléte a vérben azt jelzi, hogy az áttétképződés veszélye nagy [76; 86; 87].

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

I-III stádiumú mellrákos betegeknél az ErbB2 pozitív VKDS-ek jelenléte együtt járt a primer daganat nagyobb méretével, negatív ösztrogén receptor státuszával, alacsony

¹ Anoikis.

szövettani differenciáltságával, a nyirokérrendszer daganatos inváziójával, a betegség kedvezőtlen klinikai kimenetelével [88].

Bozionellou és mksai megmutatták, hogy a trastuzumab képes csökkenteni a VKDS-ek és a csontvelői mikrometasztázisok számát kemoterápiára rezisztens mellrákos betegeknél [89].

3. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

^m Mint a későbbiekben megmutatjuk: igen, volt hatása; a következő kérdéseket/célkitűzéseket természetesen ennek ismeretében fogalmaztuk meg.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Sejtek

Az *Irodalmi áttekintés* 2.5.2.1. részében (17. oldal) jellemzett JIMT-1 emlőrák sejteket finn kollaborációs partnerünktől kaptukⁿ (Jorma Isola, Institute of Medical Technology, University and University Hospital of Tampere, Tampere, Finland). A JIMT-1 sejteket Ham's F-12/DMEM-et (1:1), streptomycint (100 unit/100 mg), L-glutamint (2 mmol/l), 10 % Hyclone főtális borjú szérumot és 0.3 unit/ml inzulint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük [69]. Az egerekbe való oltáshoz az éppen konfluenssé vált sejtekből tripszin-EDTA (0,05 % tripszin, 0,02 % EDTA) kezeléssel készítettünk sejtszuspenziót.

Az ErbB2 pozitív, trastuzumab-kezelésre *in vitro* érzékeny SKBR3 és BT474 sejtvonalakat az American Type Culture Collection-től vettük (ATCC, Manassas, VA). Az SKBR3 sejteket 10 % Hyclone főtális borjú szérumot, streptomycint (100 unit/100 mg) és L-glutamint (2 mmol/l) tartalmazó DMEM-ben, a BT474 sejteket 20 % Hyclone főtális borjú szérumot, streptomycint (100 unit/100 mg), L-glutamint (2 mmol/l) és inzulint (0.3 unit/ml) tartalmazó RPMI-ben tenyésztettük.

4.2. Al-sejtvonalak alapítása JIMT-1 xenograftokból

A JIMT-1 X– és JIMT-1 X+ sejtvonalakat egy a kísérlet végéig fiziológiás sóval, ill. egy a kísérlet végéig trastuzumabbal kezelt egér daganatából alapítottuk. Izofuránnal (Forane[®], Abbott Laboratories Ltd. Queenborough, UK) végrehajtott eutanázia után az állatokból kivett daganatokat steril ollóval és szikével apró darabokra vágtuk, steril PBS-sel (150 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 8.6 mM Na₂HPO₄*12H₂O, 1.69 mM KH₂PO₄) kétszer mostuk, ezután Ham's F-12/DMEM-et (1:1), streptomycint (100 unit/100 mg), L-glutamint (2 mmol/l), 20 % Hyclone főtális borjú szérumot és 0.3 unit/ml inzulint tartalmazó médiumban sejtenyésztő edénybe tettük. A JIMT-1 X+ sejtek tápfolyadéka 10 µg/ml trastuzumabot is tartalmazott

ⁿ A sejtvonal azóta megvehető Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-től (www.dsmz.de).

[68]. A halott sejteket és a törmeléket 3 nap múlva eltávolítottuk, és kicseréltük a tápfolyadékot. A konfluens sejt kultúrákat tripszin-EDTA (0,05 % tripszin, 0,02 % EDTA) kezeléssel vettük fel, majd 1:2 arányban új sejtenyésző edényekbe tettük. A tápfolyadék ettől kezdve csak 10 % szérumot tartalmazott. A JIMT-1 X+ sejtek a sejtvonal alapítása óta 10 µg/ml trastuzumab koncentráció mellett nőnek.

4.3. SCID és nude egerek

A SCID (severe combined immunodeficiency) 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 nincs sem T sem B sejt immunitás [90]. Kísérleteinkben fiatal (7-12 hetes), *non-leaky* SCID egereket használtunk: 10-14 hónapos korára, a hordozott mutáció ellenére, csaknem minden egérben kialakul valamilyen fokú B és T sejt immunitás; még 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). Kísérleteinket csak olyan egerekkel végeztük, amelyek IgM koncentrációja 100 ng/ml alatt volt (*non-leaky* egerek) [91]. Az állatkísérleteinkhez a DE OEC Bőrgyógyászati Klinika patogénmentes környezetben tenyésztett SCID egereit használtuk (az egér kolónia a Fox Chase Cancer Center laboratóriumából származik, Philadelphia, Pennsylvania, USA).

A *nude/nude* mutációval rendelkező nude egereknek nincs tímuszuk és nem képesek T sejt immunválaszra. A SCID egerekkel ellentétben képesek viszont B sejt válaszra tímusz-intependens antigének esetén [92; 93]. A nude egerekkel (*nu/nmri* egerek, Harlan, Netherland, Horst, the Netherlands) végzett kísérletet finn kollaborációs partnerünk végezte el (Institute of Medical Technology, University and University Hospital of Tampere, Tampere, Finland). Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem és Tamperei Egyetem etikai bizottságainak engedélyével végeztük.

4.4. Az egerek oltása daganatos sejtekkel, az egerek kezelése, a xenograftok nagyságának becslése

Kísérleteink során 5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk 150 µl Hanks' puffer (143 mM NaCl, 1 mM Na₂SO₄, 5 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂,

5 mM Glükóz, 10 mM Hepes, pH = 7,4.) és 150 µl Matrigel^o (BD MatrigelTM, BD Biosciences) keverékében fiatal, nőtény nude vagy SCID egerek bőre alá. A JIMT-1 sejtekkel oltott egerek hetente egyszer kaptak 5 µg/g trastuzumabot vagy rizuximabot intraperitoneálisan (i.p.). A trastuzumab-F(ab')₂-t ötször nagyobb koncentrációban adtuk (25 µg/g) a teljes IgG és az F(ab')₂ *in vivo* eltérő féléletideje miatt [94]. A kontroll egerek hetente egyszer kaptak 100 µl fiziológiás sóoldatot i.p.

Hetente mértük tolómérővel az egerekben kifejlődött daganatok három kiterjedését (hossz, szélesség, magasság), a 3 paramétert összeszorozva becsültük meg a daganatok térfogatát (mm³).

4.5. Az egerek véreztetése, a xenograft kivétele, csontvelővétel

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

4.6. Mononukleáris sejtek szeparálása vérből és csontvelőből

Az egerek vérének, csontvelőjének, és az egészséges emberek által adott vért eredeti térfogatuk kétszeresére hígítottuk PBS-sel, majd Ficoll sűrűséggradiens centrifugálást (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) végeztünk. A mononukleáris sejtréteget leszívtuk, a sejteket a további kísérleteknek megfelelően készítettük elő.

4.7. Immunhisztokémia, immuncitokémia

A cryomatrixban lefagyasztott dagantokból SHANDON AS-620E Cryotome-mal (Thermo Electron Corporation) 20 µm vastagságú metszeteket készítettünk (-25 °C-on). A metszeteket szilanizált (3-aminopropyl-triethoxysilane, A-3648, Sigma-Aldrich) tárgylemezekre húztuk,

^o Az extracelluláris mátrix (e. m.) fehérjékben igen gazdag Engelbreth-Holm-Schwarm egér szarkómából előállított szolubilizált bazális membrán, amely – többek között – tartalmaz strukturális e. m. elemeket (laminin, 4-es típusú kollagén, entaktin), növekedési faktorokat (EGF, PDGF, TGF-β, IGF-1) és mátrix metalloproteinázokat. 4 °C-on folyékony, 37 °C-on pár perc alatt szilárd, 3 dimenziós mátrixot képez.

20 percig 4 %-os formaldehid-PBS-ben fixáltuk, kétszer mostuk PBS-ben (15 perc), egyszer 1 mg/ml BSA-t (bovine serum albumin) tartalmazó PBS-ben (20 perc), majd 100 µl térfogatú, 80 µg/ml antitest és 1 mg/ml BSA koncentrációjú PBS-t tettünk a mintákra. A jelölést nedveskamrában, 4 °C-on, sötétben, 1 napig végeztük. Másnap a mintákat háromszor mostuk PBS-ben (15 perc), majd 15 µl Mowiol (Merck) (a fluoreszcens festékek kiégését gátló anyag) rácsöppentése után fedőlemezzel lefedtük.

A vérből és a csontvelőből szeparált mononukleáris réteg sejtjeit kétszer mostuk PBS-ben, egyszer 1 mg/ml BSA-PBS-ben, majd 50 µl térfogatú, 80 µg/ml antitest és 1 mg/ml BSA koncentrációjú PBS-t adtuk hozzájuk. A jelölést jégen, 30 percig, sötétben végeztük. A mintákat ezután kétszer mostuk PBS-sel, 1 %-os paraformaldehid-PBS-sel fixáltuk, és kamrába (Lab-Tek[®] Chambered Coverglass System, Nalge Nunc International Corp) tettük.

4.8. Antitestek

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

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

^P GAHIG (H+L): kecskében termeltetett humán IgG ellenes antitest, amely felismeri a humán IgG könnyű és nehéz láncát is.

4.9. Fab fragmentum preparálása

Az antitestek Fab fragmentumait egy korábban ismertetett módszer szerint állítottuk elő [95]. Röviden: A teljes antitestet pH = 8.00 PBS-be (100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) dializáltuk, majd L-cisztein jelenlétében papainnal emésztettük (11 percig 37 °C-on). Az emésztést jóacetamiddal állítottuk le, az Fab és Fc fragmentumokat tartalmazó frakciókat Sephadex G-100 oszlopon választottuk el. Végül az Fab fragmentumokat protein A oszlop alkalmazásával választottuk el az Fc résztől.

4.10. Trastuzumab-F(ab')₂ fragmentum preparálása

A Trastuzumab-F(ab')₂ fragmentumot az irodalomban leírt módszer alapján preparáltuk [94; 96]: 20 mg trastuzumabot 20 mmol/l acetát pufferben (pH = 4.5) oldottunk fel, majd háromszor dializáltuk ugyanebbe a pufferbe Centricon-10-es csöveket használva (Millipore Corp.). Az IgG-t 0.5 ml immobilizált pepszinnel (Pierce Biotechnology) emésztettük 37 °C-on 6 órán át. A reakciót 10 ml 2 mol/l Tris-sósavval (pH = 8.2) állítottuk le. Az emésztett trastuzumabot 0.22 µm-es szűrőn (Millipore Corp.) szűrtük át, hogy az agaróz gyöngyökhöz kötött immobilizált pepszint eltávolítsuk. Ezután az emésztett mintákat Centricon-50-es csövekkel (Millipore Corp.) töményítettük. A trastuzumab-F(ab')₂-t az emésztetlen trastuzumabtól high-performance liquid kromatográfiával (HPLC) választottuk el Sephacryl S-300 gyantával (Pharmacia LKB) töltött 10 × 800 mm-es oszlopon. Az oszlopot 50 mmol/l koncentrációjú Na-foszfáttal (pH = 7.0) mosva 0.5 ml-nyi frakciókat gyűjtöttünk. A frakciókból vett mintákat nem-redukáló SDS-PAGE-dzsel [8 %-os gélben (5.7 ml desztillált víz, 1.6 ml ProSieve 50 gel solution (Cambrex Bio Science), 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH = 8.8), 0.1 ml 10 % SDS, 0.1 ml 10 % APS (ammónium-perszulfát), 4 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin) 14 µl-nyi mintát 6 µl, β-merkaptotanol mentes^q mintapufferben (1.51 g TRIS, 20 g glicerol, 40 ml 10 % SDS, 2 mg brómfenolkék, 80 ml desztillált víz) futtattuk] teszteltük. Azokat a frakciókat öntöttük össze és neveztük trastuzumab-F(ab')₂-nek, amelyek nem tartalmaztak emésztetlen trastuzumabot. A trastuzumab-F(ab')₂-t Centricon-50-es csövekkel töményítettük, 0.22 µm-es szűrővel sterilre szűrtük és -20 °C-on tároltuk.

^q β-merkaptotanol hiányában (nem-redukáló SDS PAGE) az antitest diszulfid-hídjai épek maradtak, nem váltak szét a könnyű és a nehéz láncok: egy sávban láttuk a teljes IgG-t és egy másikban az F(ab')₂-t.

4.11. Antitestek és Fab fragmentumok konjugálása fluoreszcens festékekkel

Az antitestek jelöléséhez használt fluoreszcens festékeket (Alexa-488-szukcinimidil-észter (Alexa488), Alexa-546-szukcinimidil-észter (Alexa546) és Alexa-647-szukcinimidil-észter (Alexa647) a Molecular Probes-tól vettük (Eugene, Oregon, USA); a jelölést a korábban leírt módszerek alapján végeztük [97; 98]. Az antitesthez nem kötődött festéket gél-szűréssel távolítottuk el Sephadex G-25 oszlop segítségével. A festék-fehérje jelölési arányt spektrofotometriásan határoztuk meg, melynek értéke körülbelül 3:1 volt teljes IgG esetben, míg Fab fragmentumoknál 1:1.

4.12. Fluoreszcencia in situ hibridizáció (FISH)

A humán, daganatos sejteket kettős célpontú FISH-val különítettük el az egér sejtektől: Egy egészséges SCID egér izomszövetéből izolált teljes genomi DNS (DNeasy Blood és Tissue Kit (QIAGEN, Budapest, Hungary)) 1 µg-ját nick translációs kit-tel (Vysis Inc., Downers Grove, IL USA) SpectrumRed-dUTP-vel (Vysis Inc.) jelöltük. Kétszáz ng jelölt, egér DNS-t összekevertünk 100 µg Cot-1 DNS-sel (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), a DNS-t standard módszerrel kicsaptuk és 10 µl hibridizációs oldatban (55 % formamide, 10 % dextrán-szulfát, 2x SCC (0,3 M NaCl, 0,03 M Na-citrát, pH = 7,0)) oldottuk fel, amely tartalmazott 1 µl, SpectrumGreen-nel jelölt, humán X kromoszóma centromérára specifikus DNS próbát (Vysis Inc.). A hibridizációs elegyet összekevertük, denaturáltuk (5 perc 70 °C-on) és 30 percig 37 °C-on inkubáltuk a próba kötődésének megkönnyítése érdekében

Az egerek véréből vagy csontvelőjéből sűrűséggrádiens centrifugálással gyűjtött mononukleáris sejteket metanol : ecetsav 3:1 arányú elegyével fixáltuk, tárgylemezre csöppentettük, levegőn megszárítottuk, denaturáltuk (70 % formamide, 2x SCC, 3 perc 73 °C-on), felszálló alkoholsorral dehidratáltuk (70 %, 85 %, 100 %), 0,25 µg/ml proteináz K-t (Sigma) és 2mM CaCl₂-ot tartalmazó 20 mM-os TRIS pufferrel (pH = 7,5) kezeltük (7,5 perc 37 °C-on), majd újra dehidratáltuk; végül a sejtekhez adtuk a fent leírt módon előkészített hibridizációs elegyet. A mintákat egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, a nem kötődő DNS próbákat 45°C-os hibridizáló oldattal távolítottuk el (3 mosás). Végül 15 µl Vectashieldben (Vector USA) (a fluoreszcens festékek kiégését gátló anyag) oldott DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vysis) (0.3 µg/ml) rácsöppentése után fedőlemezzel fedtük a mintákat [99; 100].

4.13. Fluoreszcens mikroszkópia

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

4.14. Konfokális mikroszkópia

A gyorsfagyasztott metszetekről és a kamra aljára ülepedett keringő daganatos sejtekről Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss AG, Germany) készítettük a felvételeket egy 63-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,4) olajimmerziós objektívvel. Az Alexa488 fluoreszcens festéket az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 505-530 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az Alexa546 és a Cy3 festékeket a He-Ne lézer 543 nm-es vonalával gerjesztettük, az emissziójukat pedig egy 560-615 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az Alexa647 festéket a He-Ne lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 650 nm-es felüláteresztő szűrőn keresztül detektáltuk. A transzmissziós felvételek készítéséhez a He-Ne lézer 633 nm-es vonalát használtuk.

4.15. Az ADCC *in vitro* vizsgálata

Az *in vitro* ADCC próbát korábban ismertetett módszerek módosításával végeztük [101; 102]. Röviden: Az egészséges donorokból Ficoll sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejteket (*effektor sejtek*) 10 % FCS-t tartalmazó DMEM-ben vettük fel. A növekedésük exponenciális szakaszában lévő JIMT-1, JIMT-1 X-, JIMT-1 X+ és SKBR3 sejteket (*target sejtek*) tripszin-EDTA (0,05 % tripszin, 0,02 % EDTA) kezeléssel vettük fel, egyszer mostuk 1 mg/ml BSA-PBS-ben, majd 10 µmol/l koncentrációjú 5-,6-

karboxyfluoreszcein diacetát, szukcinimidil észterrel (CFDA-SE; Molecular Probes Inc.) jelöltük (37 °C, 10 perc). A daganatos sejteket ezután háromszor mostuk 10 % FCS-t és 1 % BSA-t tartalmazó DMEM-mel, hogy eltávolítsuk a nem kötődött CFDA-SE-t. A mosások között 5-5 percig 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Végül a jelölt target sejteket 10 % FCS-t tartalmazó DMEM-ben vettük fel és 2:1, 6:1, 15:1, 30:1 és 60:1 effektor/target (E/T) arányban kevertük össze az effektor sejtekkel. A mintákhoz 100 µg/ml-es koncentrációban trastuzumabot, trastuzumab-F(ab')₂-t vagy rituximabot adtunk. 8 órás 37 °C-on történő inkubálás után a halott sejteket propidium-jodiddal (PI, 50 µg/ml) festettük. A mintákat egy FACScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) mértük le. Mintánként 10 000 sejt fluoreszcens jelét detektáltuk: a CFDA-SE-t és a PI-ot is az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az előbbi emisszióját egy 530±30 nm-es sávszűrőn keresztül az FL-1 csatornában, az utóbbit egy 630±22 nm-es sávszűrőn keresztül az FL-3 csatornában detektáltuk, logaritmikus módban. Minden mintához készítettünk negatív kontrollt, amely ugyanúgy készült, mint a minta, kivéve, hogy effektor sejteket nem tettünk bele. A pozitív kontrollokban a sejteket 4 %-os paraformaldehid-PBS-sel öltük meg. A megölt target sejtek százalékát az alábbi képlettel számítottuk ki: (élő target sejtek százaléka a negatív kontrollban – élő target sejtek százaléka a mintában) / élő target sejtek százaléka a negatív kontrollban.

4.17. Az *in vitro* trastuzumab-érzékenység vizsgálata

Alamar Blue (resazurin [103]) módszerrel (TREK Diagnostic Systems, Inc.) vizsgáltuk a trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ hatását a JIMT-1, SKBR3 és BT474 sejtek életképességére. A növekedésük exponenciális szakaszában lévő sejteket tripszin-EDTA (0,05 % tripszin, 0,02 % EDTA) kezeléssel vettük fel, és 96 lyukú, lapos aljú sejtenyésztő lemez lyukaiba tettünk sejtvonaltól függően 4500-8000 darab sejtet. A sejtvonalnak megfelelő sejtenyésztő folyadékot egy napos tenyésztés (37 °C, 95 % levegő, 5% CO₂) után kicseréltük 0, 1, 10 ill. 100 µg/ml trastuzumab vagy trastuzumab-F(ab')₂ koncentrációjú médiumra. 72 órás tenyésztés (37 °C, 95 % levegő, 5% CO₂) után a mintákhoz 20 µl AlamarBlue-t cseppentettünk; a fluoreszcencia intenzitást 5 óra múlva detektáltuk Wallac Victor2 plate olvasóval (Perkin-Elmer) 544 nm-es gerjesztési és 590 nm-es emissziós hullámhosszon.

4.18. A konfokális mikroszkóppal felvett képek elemzése

A konfokális mikroszkópos képeket a Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA) alatt futó DipImage programmal (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) elemeztük. A kép szegmentálása során a sejtmembránhoz tartozó pixeleket egy általunk írt program segítségével azonosítottuk, amely a szemi-automatikus „watershed” algoritmuson alapult [104]. A fluoreszcencia intenzitásokat csak a sejtmembrán pixelek által alkotott maszkhoz tartozó területen határoztuk meg. Az így kiszámított membránfluoreszcencia-intenzitás értékéből levontuk a háttér intenzitását, amelyet egy látható fluoreszcens jelölődést nem mutató terület fluoreszcencia intenzitás átlagaként határoztunk meg.

4.19. Statisztika

Az adatok 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 ($P < 0.05$).

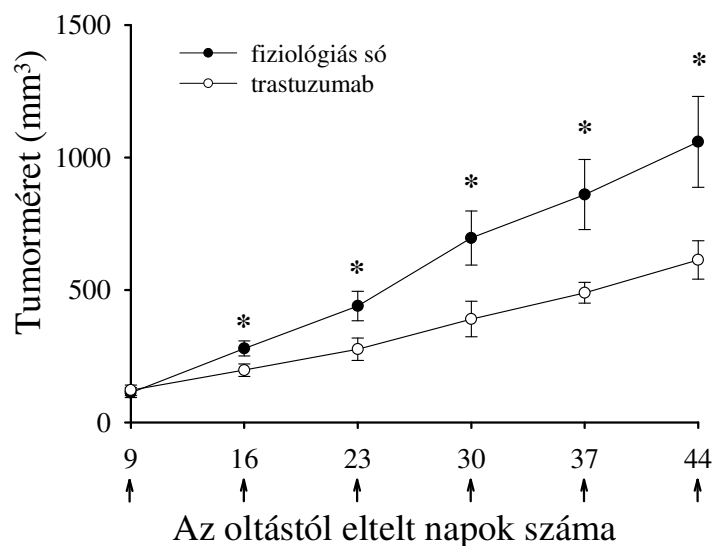
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5.1. Korai trastuzumab kezelés hatása a JIMT-1 xenograftokra

Az *Irodalmi áttekintés* című fejezet végén említettem, hogy finn kollaborációs partnerünk egy 62 éves, mellrákos nőbeteg mellüregi daganatos folyadékgyüleméből alapította a JIMT-1-nek elnevezett sejtvonalat. A beteg, daganatának ErbB2 pozitivitása ellenére klinikailag rezisztens volt trastuzumabra. Az ErbB2 pozitív JIMT-1 sejtek in vitro és in vivo rezisztensnek bizonyultak trastuzumab kezelésre (5. ábra a 18. oldalon). Mivel az *in vivo* kísérletet úgy végezték el, hogy a JIMT-1 sejtekkel oltott egereket az oltás utáni 45. napon kezdék el trastuzumabbal kezelni (nyíl mutatja az 5. ábrán) (a daganatok térfogata ekkor 200 - 500 mm³ volt), kíváncsiak voltunk, vajon van-e valamilyen hatása a trastuzumabnak akkor, ha korábban, kisebb daganatméretnél kezdjük el az egerek kezelését.

5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egér bőre alá. A daganatos sejtekkel való oltás utáni 9. napon, amikor a daganatok térfogata 100 - 200 mm³ volt, 8 egeret fiziológiás sóoldattal, 8 egeret pedig 5 µg/g trastuzumabbal kezdtünk el kezelni. A kezelést a

6. ábra. A 9. napon kezdett trastuzumab-kezelés hatása



kísérlet végéig folytattuk (6. ábra, a nyilak a kezeléseket mutatják). Meglepetésünkre a trastuzumabbal kezelt egerekben lassabban növekedtek a daganatok: a trastuzumab a kísérlet 16. és 44. napja között a fiziológiás sóval kezelt egerekhez képest szignifikánsan csökkentette a daganatnövekedést (*, $P < 0.05$).

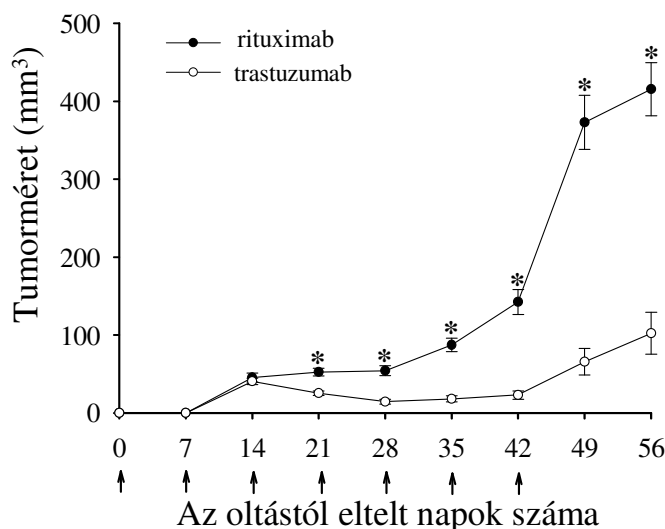
5.2. A trastuzumab kezelés hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre

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

5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk 14 fiatal, nőstény nude egér bőre alá. Az egereket a daganatsejtekkel való oltással azonos napon (0. nap) kezdtük kezelni: 7 egeret rituximabbal, 7 egeret trastuzumabbal. A rituximabot (humán CD20 ellenes, humanizált, monoklonális antitest) negatív kontrollként használtuk: a JIMT-1 sejteken nincs CD20, az egér CD20 receptoraihoz pedig az egér és az ember CD20 receptora közti 16 aminosavnyi különbség miatt nem kötődik a rituximab [105].

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

7. ábra. A daganatos sejtekkel való oltással azonos napon kezdett trastuzumab-kezelés hatása (nude egerekben)

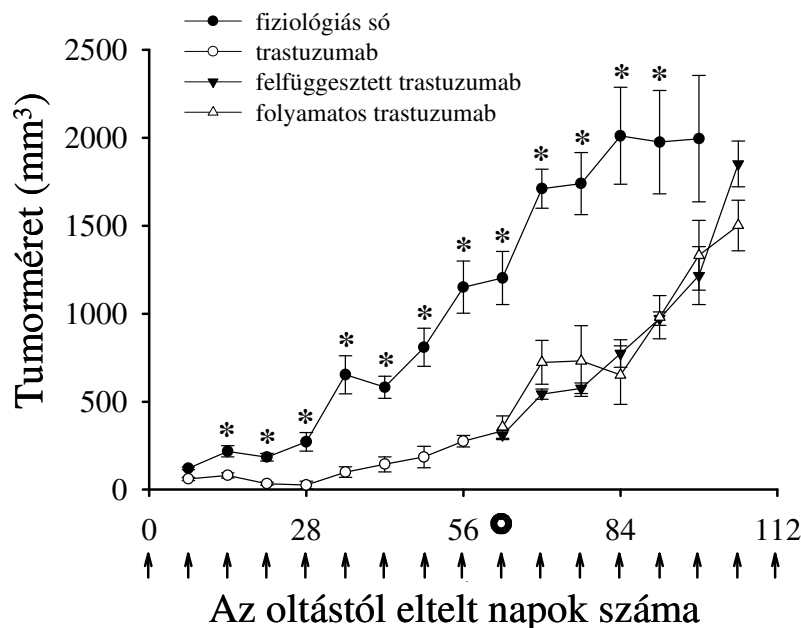


egerekhez képest (*, $P < 0.05$). Fontos megjegyezni, hogy abban a 2 egérben, amelyekben a trastuzumab-kezelés ellenére kifejlődött daganat, a kezelés leállítása után a daganatok növekedésnek indultak (7. ábra, a nyilak a kezeléseket mutatják)^r.

A kísérletet megismételtük SCID egerekkel:

5×10^6 darab JIMT-1 sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egér bőre alá. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük^s. Bár jóval lassabban, mint a kontroll egerekben, de mind a 8 trastuzumabbal kezelt egérben növekedésnek indultak a daganatok. A növekedés azonban a 14. napra megállt, sőt, a daganatok mérete csökkenni kezdett: a 28. napon a méretük minimális volt, 8-ból három egérben nem is tudtunk daganatot tapintani. Ezután a daganatok ismét növekedni kezdtek, a 35. naptól a növekedésük exponenciális volt. A 63. napon a trastuzumabbal kezelt egerek felének kezelését leállítottuk (●): nem tapasztaltunk különbséget a trastuzumabot tovább kapó

8. ábra. A daganatos sejtekkel való oltással azonos napon kezdett trastuzumab-kezelés hatása (SCID egerekben)



^r Ezt az állatkísérletet finn kollaborációs partnereink végezték.

^s Rendszerünk olyan a sebészeti beavatkozás utáni állapotot modellezett, amikor a visszamaradt daganatos sejtek még nem képeznek makroszkópos daganatot, hanem szétterülnek az egészséges szövetekben.

(folyamatos trastuzumab) és a trastuzumabot többé nem kapó (felfüggesztett trastuzumab) egerek daganatainak növekedésében. Ez azt bizonyította, hogy a 63. naptól a daganatok növekedését egyáltalán nem befolyásolta a trastuzumab. Az, hogy a kísérlet 71. napjáig (a 14. naptól) a trastuzumabbal kezelt egerek daganatainak mérete szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll egereké (*, $P < 0.05$), a trastuzumab első 6 héten át kifejtett gátló hatásának a következménye (8. ábra, a nyílak a kezeléseket mutatják).

Érdekes, hogy az általunk JIMT-1 sejtekkel oltott összes SCID egérben kifejlődött daganat, míg 7 nude egérből csak 2-ben. Mindezt azzal magyarázzuk, hogy a SCID egerek immunrendszere gyengébb a nude egerekénél: a nude egerek a SCID egerekkel ellentétben képesek B sejtválaszra tímusz-independens antigének esetén [92; 93].

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

Eddig bemutatott kísérleteink két fontos kérdést¹ vetnek föl:

- Hogyan tapasztalhattunk ilyen különbséget a JIMT-1 sejtek *in vitro* és *in vivo* trastuzumab-érzékenysége között?
- Vajon mi történt a JIMT-1 sejtekkel a 8. ábrán bemutatott kísérlet 2. és 6. hete között, amikor az addig trastuzumabra érzékeny sejtek rezisztenssé váltak?

¹ Legalább kettőt.

5.3. A trastuzumab-F(ab')₂ tesztelése

A fent megbeszélte eredményeink alapján a következő elméletet állítottuk fel: Általánosságban igaz, hogy a trastuzumab *in vitro* hatásáért az antitest ErbB2-höz kapcsolódásával elindított folyamatok vezetnek. De mert a JIMT-1 sejtekre a trastuzumab *in vitro* teljesen hatástalan, úgy gondoljuk, hogy az antitest *in vivo* daganatnövekedést gátló hatásáért nem az antitest ErbB2-höz kapcsolódó Fab része, hanem az Fc része a felelős. Elméletünk szerint az Fc-receptorral rendelkező immunsejtek (NK sejtek, neutrofil granulociták, monociták, makrofágok), amelyek működőképesek nude és SCID egerekben is [90; 106; 107], ölik meg a daganatsejteket trastuzumab közvetítette ADCC-vel. Ha mindez igaz, akkor a trastuzumabnak *in vivo* hatástalanná kell válnia, ha Fc részét eltávolítjuk. Az elméletünk bizonyítására megfelelő mennyiségű és minőségű trastuzumab-F(ab')₂-t kellett előállítanunk^u.

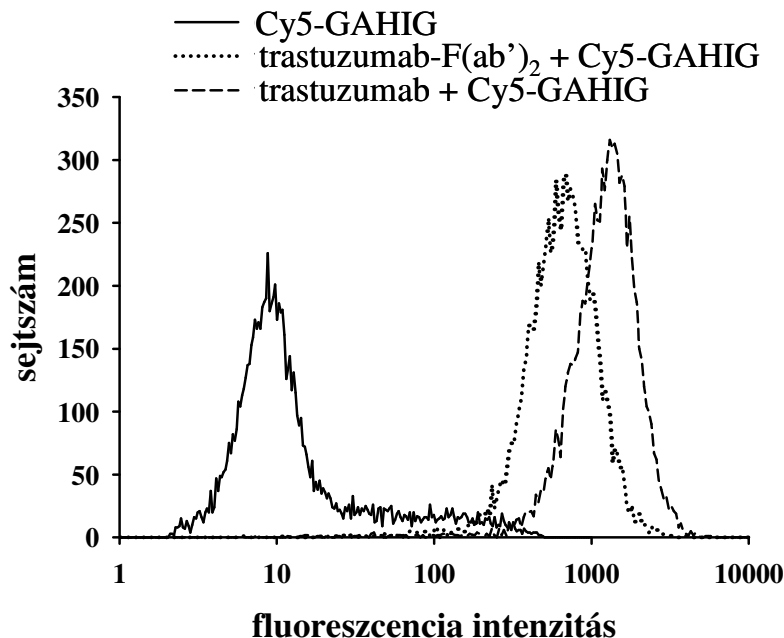
Az *Anyagok és módszerek* című fejezetben leírtak szerint előállított trastuzumab-F(ab')₂ minőségét az alábbi 4 kísérlettel ellenőriztük:

Képes-e a trastuzumab-F(ab')₂ in vitro a sejtekhez kötődni?

JIMT-1 sejteket inkubáltunk jelöletlen trastuzumab-F(ab')₂-vel vagy jelöletlen trastuzumabbal. Mosások után olyan poliklonális másodlagos antitestet adtunk a mintákhoz, amely a humán IgG könnyű- és nehézláncát is felismeri (GAHIG = goat anti-human IgG (H+L)). A 9. ábrán látszik, hogy a trastuzumab-F(ab')₂-vel és a trastuzumabbal előinkubált sejtek is jól festődtek GAHIG-gal. Azt, hogy a GAHIG valamivel jobban kötődött a trastuzumab-hoz, azzal magyarázzuk, hogy az emésztetlen antitest meglévő Fc részéhez is kötődhetett a másodlagos antitest.

^u Az IgG-ből papainnal emésztett Fab fragmentumok monovalensek, nem képesek keresztkötésre, a pepszinnel emésztett F(ab')₂ fragmentumok viszont bivalensek, képesek keresztkötni két antigént. A keresztkötést fontosnak tartják a trastuzumab hatásmechanizmusában, ezért választottuk az F(ab')₂-t.

9. ábra. A trastuzumab-F(ab')₂ tesztelése I.

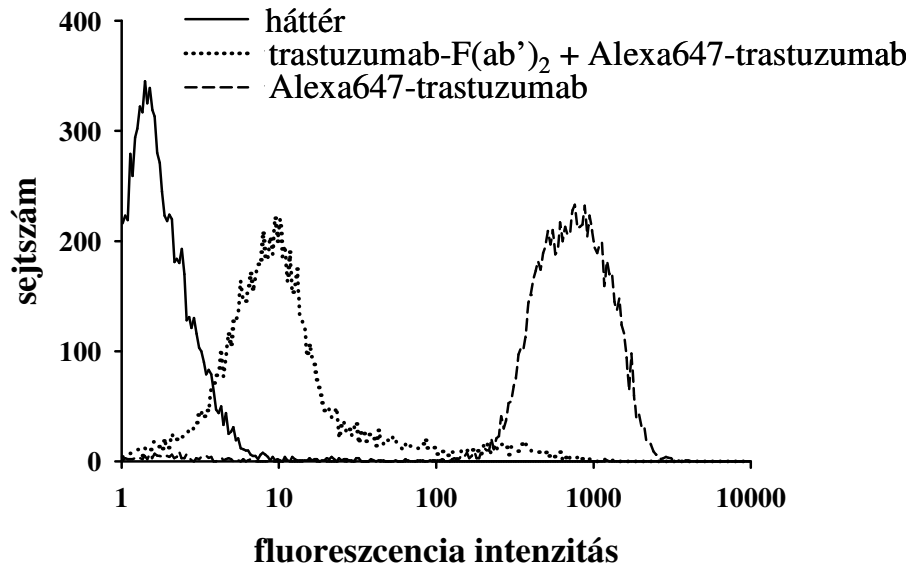


Bizonyítottuk, hogy a trastuzumab-F(ab')₂ kötődik a sejtekhez, de vajon ez specifikus, ErbB2-höz való kötődést jelent?^v

SKBR3 ErbB2 pozitív sejteket inkubáltunk jelöletlen trastuzumab-F(ab')₂-vel vagy Alexa647-trastuzumabbal. Mosás után az előbbiekhöz is adtunk Alexa647-trastuzumabot. A 10. ábra mutatja, hogy a trastuzumab-F(ab')₂ „előkezelés” csaknem teljesen meggátolta a trastuzumab kötődését a sejtek ErbB2 receptoraihoz.

^v Az emésztés-tisztítás folyamata nem tette-e „tapadóssá” az antitestet, nagymértékben aspecifikussá téve kötődését – bár a 9. ábra hisztogramjának alakja nagyon specifikus jelölést sejtetett.

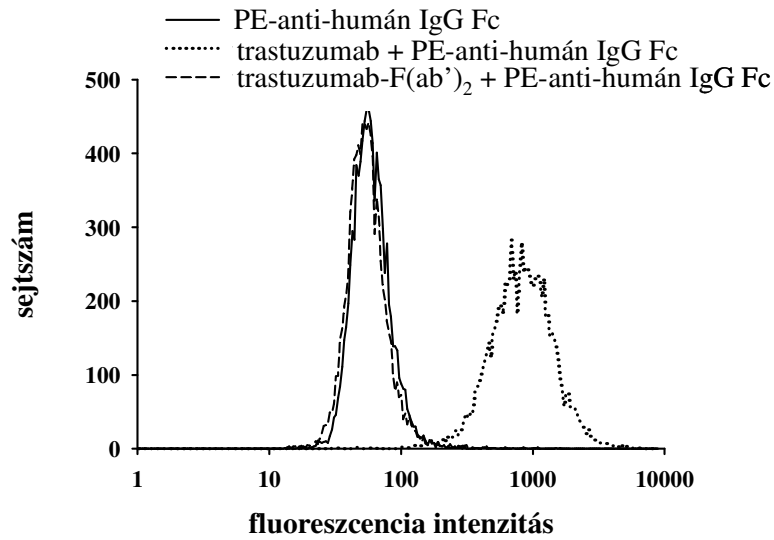
10. ábra. A trastuzumab-F(ab')₂ tesztelése II.



Mivel az ADCC vizsgálatára készültünk, az in vivo kísérletek elkezdése előtt fontos volt megvizsgálnunk, hogy tökéletes volt-e az emésztés, tényleg nem tartalmaznak az F(ab')₂ fragmentumok Fc részt?

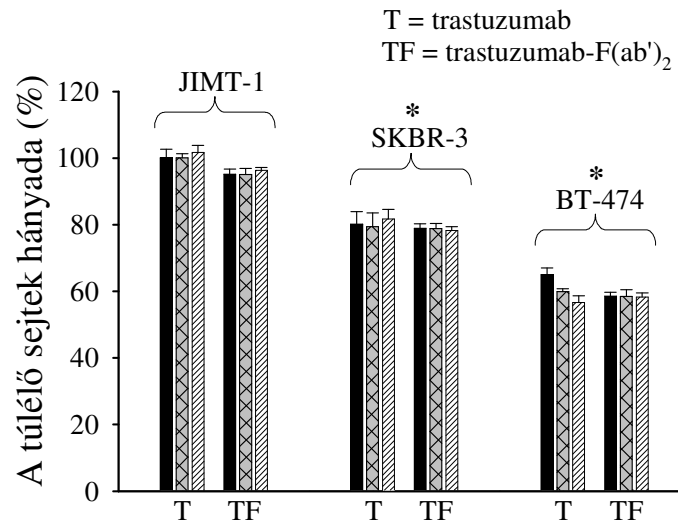
Trastuzumabbal vagy trastuzumab-F(ab')₂-vel inkubált JIMT-1 sejtekhez a humán IgG Fc részére specifikus másodlagos antitestet adtunk. A 11. ábra mutatja, hogy az Fc rész ellenes másodlagos antitest nem kötődött a trastuzumab F(ab')₂ fragmentumaival inkubált sejtekhez.

11. ábra. A trastuzumab-F(ab')₂ tesztelése III.



Végül trastuzumab-F(ab')₂-t tesztelő utolsó kísérletünkkel (amelyben a sejtek médiuma trastuzumabot (T) vagy trastuzumab-F(ab')₂-t (TF) tartalmazott) megmutattuk, hogy a trastuzumab-F(ab')₂ megőrizte biológiai hatását: az emésztetlen antitesthez hasonló mértékben képes gátolni a trastuzumab-érzékeny sejtek (SKBR3, BT474) növekedését in vitro. A JIMT-1 sejtek növekedését sem az emésztett, sem az emésztetlen antitest nem gátolta. (12. ábra; az oszlopok mintájának különbözősége különböző antitest koncentrációt jelent:

12. ábra. A trastuzumab-F(ab')₂ tesztelése IV.



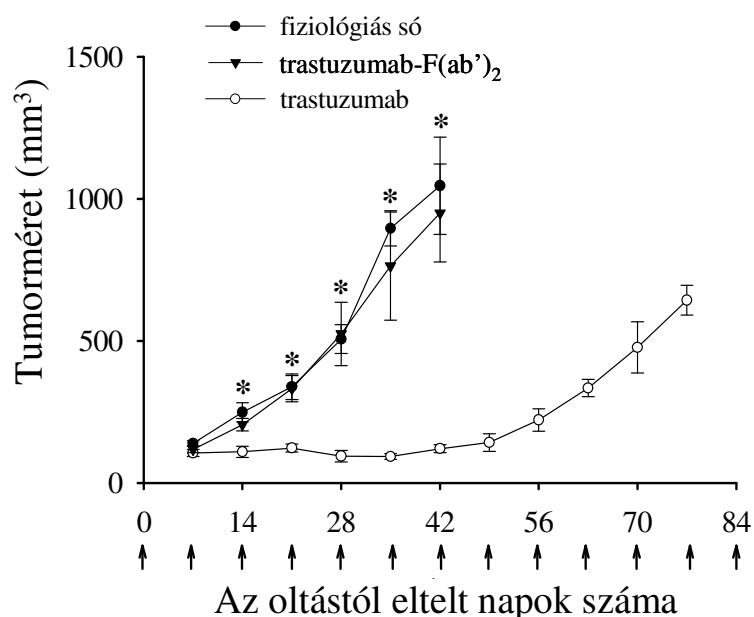
fekete: 1 µg/ml; szürke alapon keresztbesávozott: 10 µg/ml; fehér alapon sávozott: 100 µg/ml)^w

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

Mivel a trastuzumab-F(ab')₂-t megfelelő minőségűnek találtuk, hozzákezdünk a 5.3. fejezet elején kifejtett elméletünk bizonyításához.

5 × 10⁶ darab JIMT-1 sejttel oltottunk 24 fiatal, nőstény SCID egeret. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal, 8-at trastuzumab-F(ab')₂-vel kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük. A kísérlet pozitív kontrolljaként trastuzumabbal kezelt egerekben a daganatok hasonlóan viselkedtek, mint azt a korábbiakban megfigyeltük: méretük a 4-5. hétig alig változott, azután exponenciális növekedésnek indultak. A trastuzumab kezelés a kísérlet 2. és 6. hete között szignifikánsan csökkentette a daganatok méretét a fiziológiás sóval kezelt egerekhez képest (*, P < 0.05). Viszont a trastuzumab-F(ab')₂-nek semmilyen hatása nem volt a daganatnövekedésre: az F(ab')₂ fragmentumokkal kezelt egerekben ugyanolyan ütemben növekedtek a daganatok, mint a sóoldattal kezeltékben (13. ábra, a nyilak a kezeléseket mutatják).

13. ábra. A trastuzumab-F(ab')₂ hatása *in vivo*



^w Ezt a kísérletet finn kollaborációs partnereink végezték.

5.5. „Al-sejtvonalak” alapítása a JIMT-1 xenograftokból

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

5.6. *In vitro* ADCC vizsgálata trastuzumab érzékeny és rezisztens sejtvonalokon

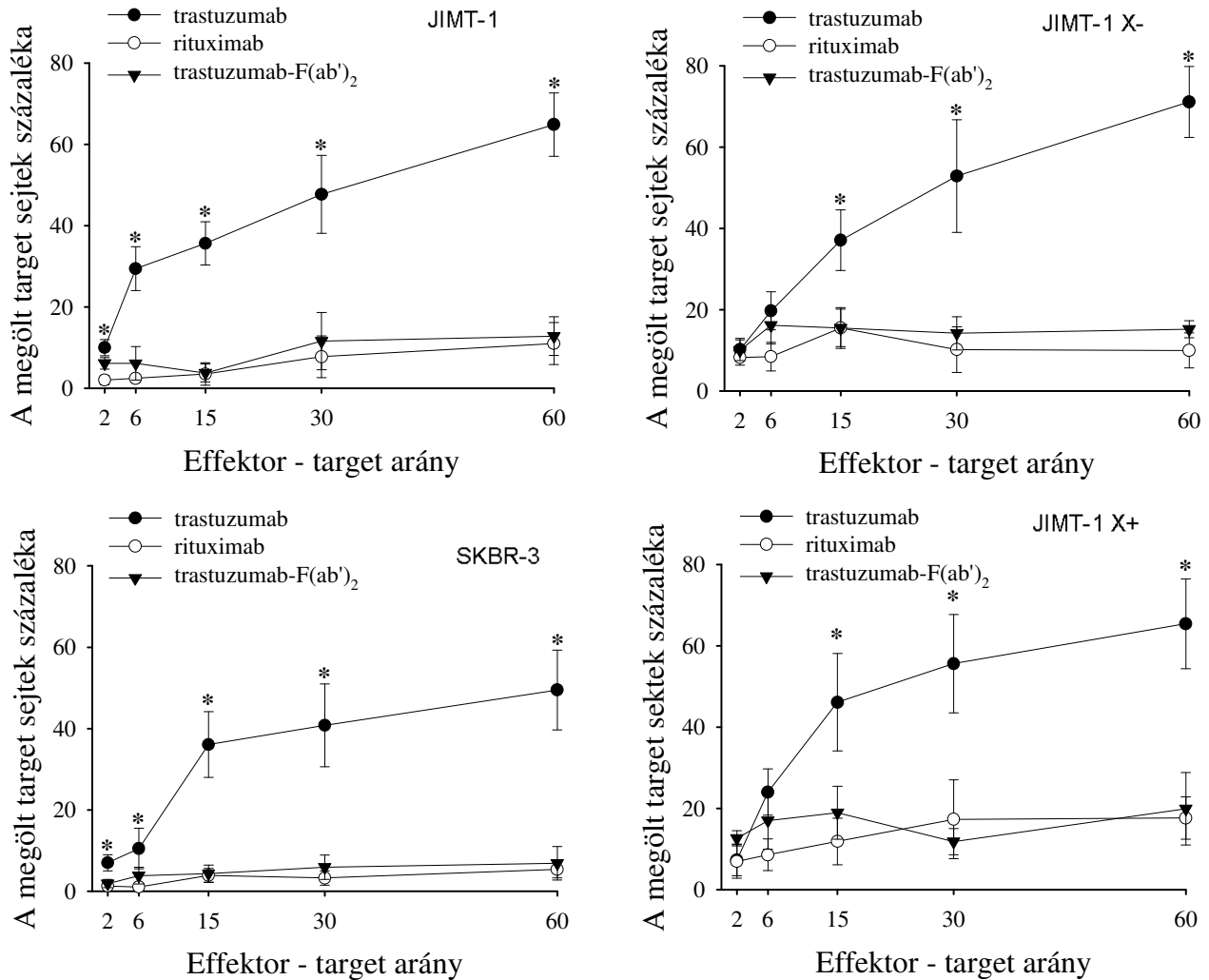
Fenti kísérletünkben a daganatok *in vivo* növekedését a trastuzumab gátolta, de a trastuzumab-F(ab')₂ nem. Feltételezésünk szerint ennek az az oka, hogy a SCID egerek immunsejtjei képesek ADCC-vel elpusztítani a JIMT-1 daganatsejteket, azok intrinzik trastuzumab rezisztenciája ellenére. Ha az elgondolásunk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

Kísérletünkben egészséges humán donorok véréből izolált mononukleáris sejteket használtunk effektor sejtnek (E), a targetek (T) pedig a JIMT-1, JIMT-1 X-, JIMT-1 X+ és az SKBR3 daganatsejtek voltak. Minden sejtvonal esetén vizsgáltuk a sejtlés mértékét trastuzumab, trastuzumab-F(ab')₂ és rituximab jelenlétében.

A kontroll rituximabot és a trastuzumab-F(ab')₂-t tartalmazó mintákban kevés daganatsejt pusztult el, nem volt szignifikáns különbség a két szer jelenlétében mért sejtlés között. Viszont a trastuzumabot tartalmazó mintákban (azokban az esetekben, amikor az effektor : target arány 15 vagy annál több volt) minden sejtvonalnál szignifikánsan nagyobb volt a sejtlés, mint trastuzumab-F(ab')₂ jelenlétében (*, $P < 0.05$). Trastuzumab jelenlétében a sejtlés annál nagyobb volt, minél nagyobb volt az effektor : target (E:T) arány, maximumát (~ 50-60 %-os sejtlést) a legnagyobb, 60:1-es E:T aránynál érte el (14. ábra).

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

14. ábra. Az ADCC *in vitro* vizsgálata



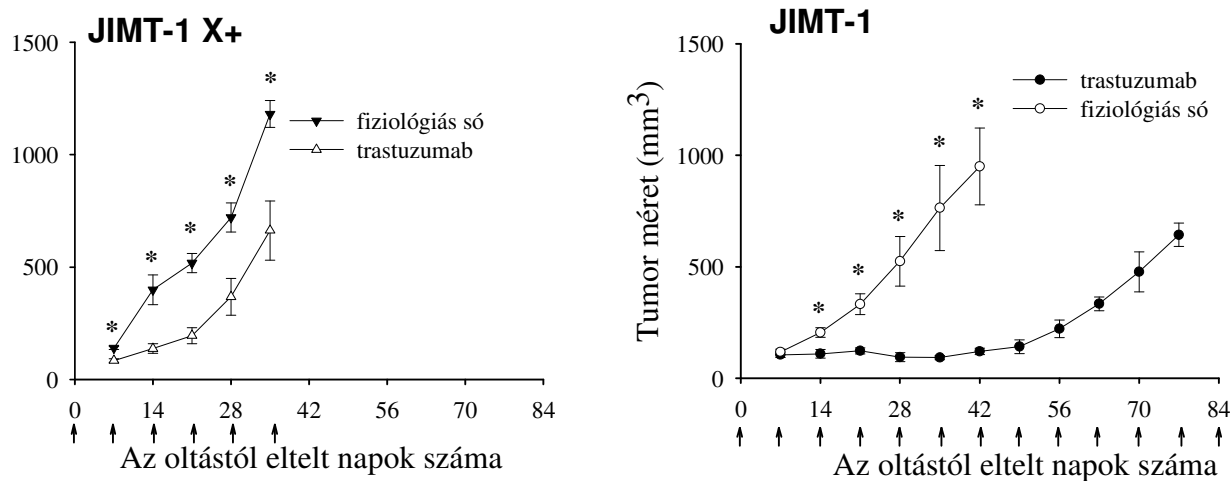
5.7. Érzékenyek-e a JIMT-1 X+ sejtek trastuzumab-kezelésre *in vivo*?

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

5×10^6 darab JIMT-1 X+ sejtet oltottunk 16 fiatal, nőstény SCID egérbe. 8 egeret fiziológiás sóval, 8-at trastuzumabbal kezeltünk. A kezelést a 0. napon kezdtük. Az X+

daganatok növekedését a trastuzumab kezelés szignifikánsan gátolta a kísérlet 7. és 35. napja között (*, $P < 0.05$). Érdekes, hogy az X+ daganatok trastuzumab-rezisztenciája hamarabb kifejlődött, mint a JIMT-1 daganatoké; az is megfigyelhető azonban, hogy az X+ daganatok a sóoldattal kezelt egerekben is gyorsabban nőttek, mint a JIMT-1 daganatok (15. ábra, a könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért az ábra jobb oldalára a JIMT-1 sejtekkel végzett, korábbi kísérletünk eredményét másoltam; a nyilak a kezeléseket mutatják). Úgy gondoljuk, hogy az általunk alapított JIMT-1 X+ sejtek *in vivo* jobban adaptálódtak az egér szöveti környezethez, ezért növekedtek gyorsabban mind a sóoldattal, mind a trastuzumabbal kezelt egerekben, mint a JIMT-1 daganatok.

15. ábra. A JIMT-1 X+ sejtek érzékenyek trastuzumab-kezelésre *in vivo*



Clynes és mksai az *Irodalmi áttekintés*ben említett és a 3. ábrán bemutatott, trastuzumabra *in vitro* érzékeny BT474 sejtekkel végzett kísérleteikben megállapították, hogy a trastuzumabnak a BT474 sejtekre kifejtett gátló hatásának mintegy 2/3 részéért az ADCC a felelős. Úgy gondoljuk, hogy az 5.3. pontban felállított elméletünk helyességét sikerült bizonyítanunk: a trastuzumabra *in vitro* rezisztens JIMT-1 sejtek *in vivo* trastuzumab-érzékenységét^x teljes mértékben az antitest által közvetített ADCC okozza.

^x Meglehet átmeneti.

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

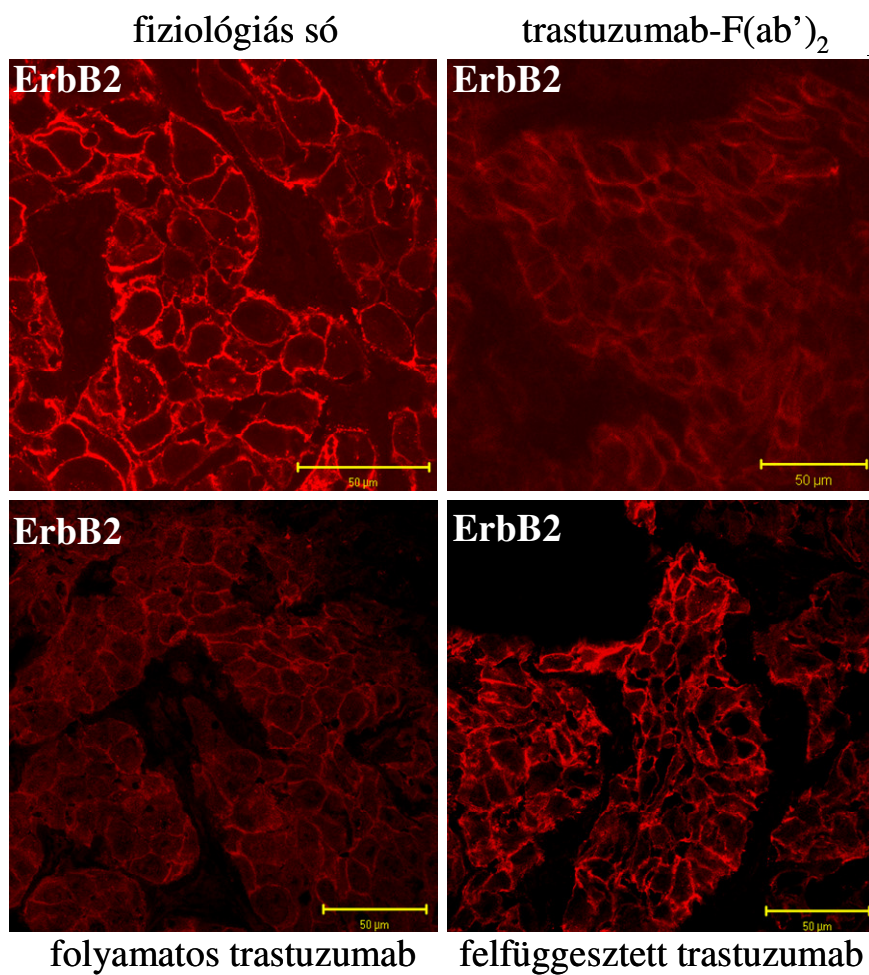
Mint az *Irodalmi áttekintés*ben említettem, a trastuzumab daganatgátló hatásában fontosnak tartják azt, hogy az antitest csökkenti az ErbB2 szintet. Kíváncsiak voltunk, vajon a mi *in vivo* modell-rendszerünkben hogyan hatott a trastuzumab- és a trastuzumab-F(ab')₂-kezelés a xenograftok ErbB2 expressziójára.

Gyorsfagyasztott metszeteket készítettünk a fiziológias sóval, trastuzumab-F(ab')₂-vel, a kísérlet végéig trastuzumab-kezelést kapó (folyamatos trastuzumab) és 9 hétig trastuzumabot kapó, majd 6 héten keresztül kezelést nem kapó (felfüggesztett trastuzumab) egerek daganataiból. A trastuzumabbal nem kompetáló, Cy3 fluoreszcens festékhez kapcsolt, ErbB2-76.5 jelű, ErbB2 ellenes antitesttel festett metszetekről konfokális mikroszkóppal, azonos beállításokkal készített felvételeken (16. ábra) végeztük el a membránfluoreszcencia kvantitatív analízisét^y. A 17. ábrán megmutatjuk, hogy a folyamatos trastuzumab és a trastuzumab-F(ab')₂ kezelés ugyanolyan hatékonyan csökkentette az ErbB2 szintet. A trastuzumab kezelés leállítása után az ErbB2 mennyisége nőtt a sejteken: 6 héttel az utolsó trastuzumab kezelés után a sejtek ErbB2 expressziója csaknem ugyanakkora volt, mint a sóoldattal kezelt kontroll egerekből származó xenograftokban.

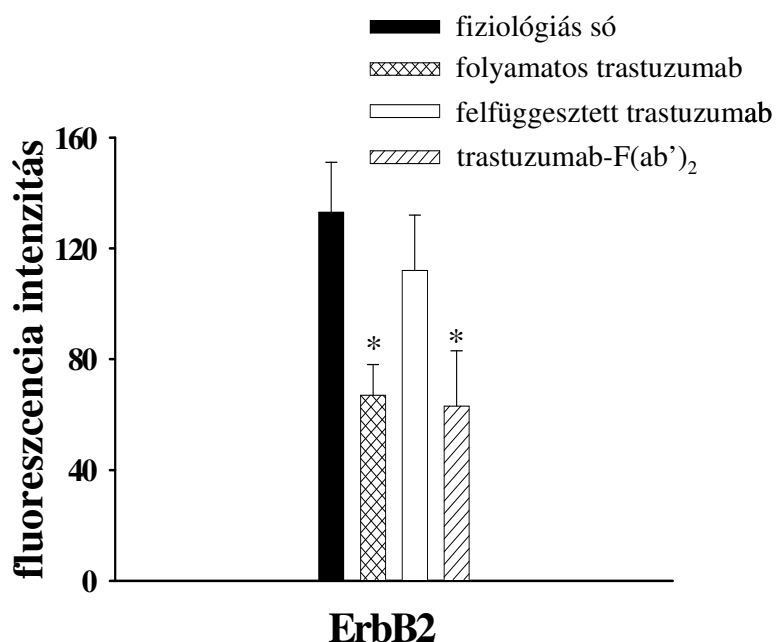
A trastuzumab-F(ab')₂-kezelés csökkentette az ErbB2 expressziót, a daganatnövekedést mégsem gátolta. Ezért úgy gondoljuk, hogy modell-rendszerünkben a trastuzumab nem az ErbB2 expreszió csökkentésén keresztül gátolta a daganatnövekedést: szétválasztottuk a trastuzumab ErbB2 szintet csökkentő és daganatnövekedést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

^y Nagy Péter végezte.

16. ábra. A trastuzumab- és a trastuzumabF(ab')₂-kezelés hatása a daganatok ErbB2 szintjére I.



17. ábra. A trastuzumab- és a trastuzumab-F(ab')₂-kezelés hatása a xenograftok ErbB2 szintjére II.

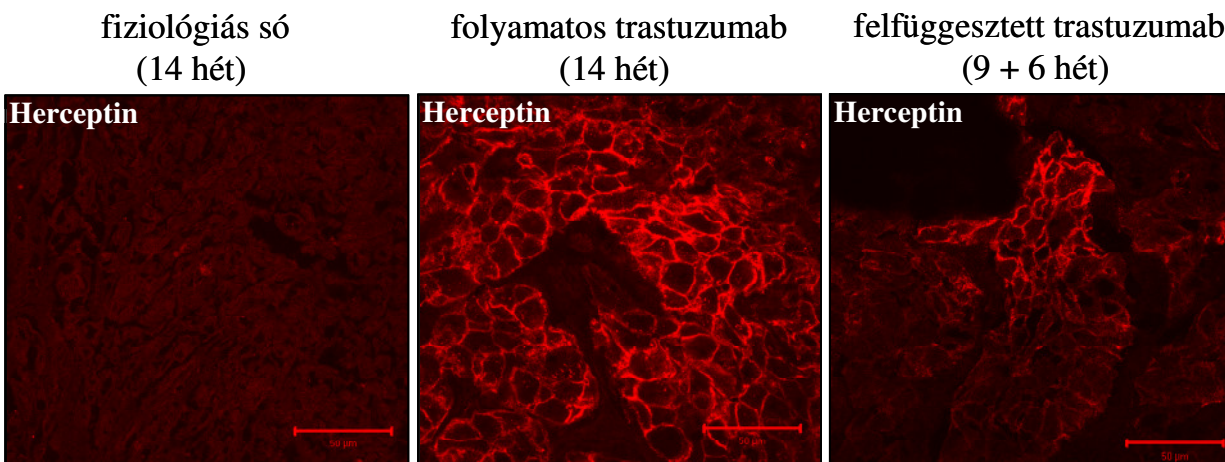


5.9. A trastuzumab-kezelés leállítása után 6 héttel trastuzumab a sejteken?

Az alábbiakban egy mellékletként kapott, érdekes eredményünkről számolok be. A fiziológiás sóval, folyamatosan trastuzumabbal ill. 9 hétig trastuzumabbal, majd 6 hétig semmivel nem kezelt egerek xenograftjaiból készített gyorsfagyasztott metszeteket Cy3 fluoreszcens festékhez kapcsolt humán IgG ellenes antitesttel festettük. A mintákról konfokális mikroszkóppal, azonos erősítésekkel felvett képeken látszik, hogy 6 héttel a kezelés leállítása után egyes sejtcsoportokon nagy mennyiségben található trastuzumab, más sejteken viszont egyáltalán nincs, vagy alig van (18. ábra, Herceptin = trastuzumab).

A trastuzumab féléletideje *emberben* 18-27 nap [108], így az talán nem meglepő, hogy a kezelés leállítása után 42 nappal kimutattuk a trastuzumab jelenlétét *egérben* növekvő humán daganatokban. Az viszont annál furcsább és érdekesebb, hogy a trastuzumab milyen egyenlőtlenül oszlik el a sejteken: a legtöbb sejten alig mutatható ki, egyes sejtcsoportokon viszont nagyon sok van. Mindennek a miértjét és a jelentőségét egyelőre csak találgatni tudjuk.

18. ábra. Trastuzumab a sejteken 6 héttel a kezelés leállítása után



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

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

Immunfluoreszcenciával:

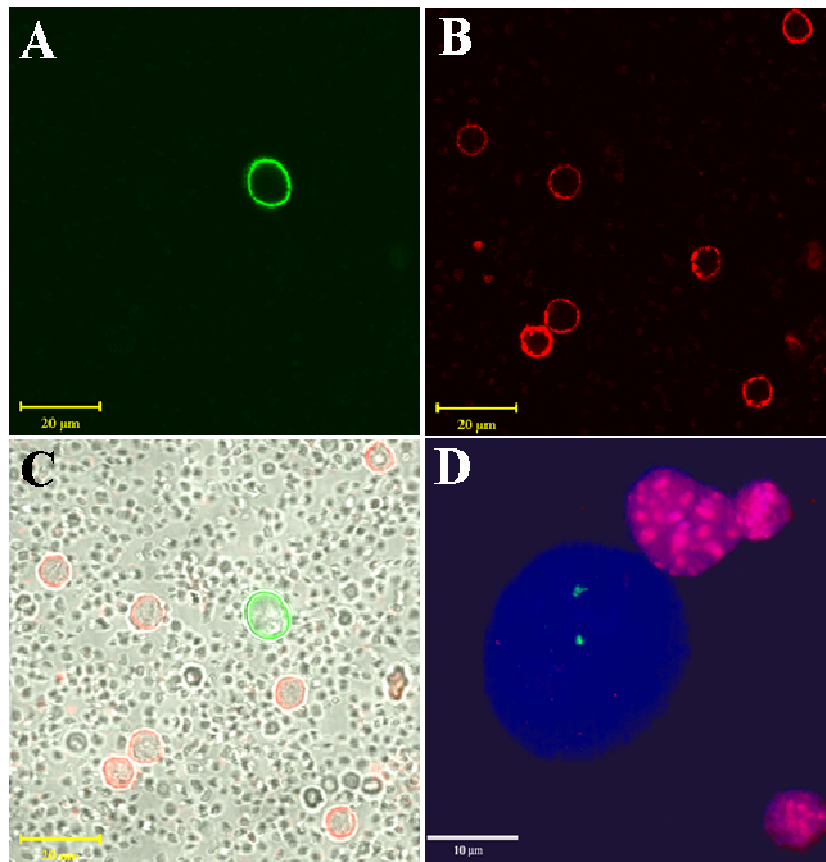
5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk 3 fiatal, nőstény SCID egér bőre alá. Amikor a daganatok mérete elérte az 1000 mm^3 -t, izofuránnal elaltattuk az egereket, majd a nyaki ütőerük átvágásával kivéztettük őket. A vérből sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejtek egy részét inkubáltuk Alexa488 fluoreszcens festékhez kapcsolt, humán MHC-I ellenes monoklonális antitest Fab fragmentumaival (W6/32-Fab) és Alexa546 festékhez kapcsolt, egér pan-CD45 ellenes monoklonális antitesttel. Azért használtuk a humán MHC-I ellenes antitest Fab fragmentumait, hogy elkerüljük az egér immunsejtjeinek Fc receptoraihoz való kötődést. Az egér CD45 ellenes antitesttel az egér fehérvérsejtjeit festettük meg, mivel a CD45-öt mind a limfoid, mind a hematopoetikus eredetű sejtek kifejezik [109; 110]. A CD45 ellenes antitest teljes IgG volt, így az Fc receptorral rendelkező immunsejtek is megköthették. A 19. ábra (A-C) mutatja, hogy az MHC-I-gyet expresszáló humán VKDS-eket (19/A, zöld) egyértelműen meg tudtuk különböztetni az CD45 pozitív egérsejtektől (19/B,

piros). (A 19. ábra A-C képei azonos látótérrel készültek, a C kép a transzmissziós felvétel és az A és B képek egymásravezítése).

Fluoreszcencia in situ hibridizációval (FISH)^z:

Az egerek véréből szeparált mononukleáris sejtek másik részén metanol : ecetsavas fixálás után kettős célpontú FISH-t végeztünk. A 19/D ábrán jól elkülöníthető a spectrum green-nel festett humán X kromoszóma ellenes próbával jelölt keringő JIMT-1 daganatsejt (19/D: nagy sejt, két X kromoszómával (*zöld*)) a spectrum red-del festett egér DNS próbával jelölt egér sejtektől (19/D: *piros*). A DNS-t DAPI-val festettük (*kék*).

19. ábra. Vérben keringő daganatos sejtek kimutatása



^z A FISH-t Balázs Margit és munkacsoportja végezte.

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

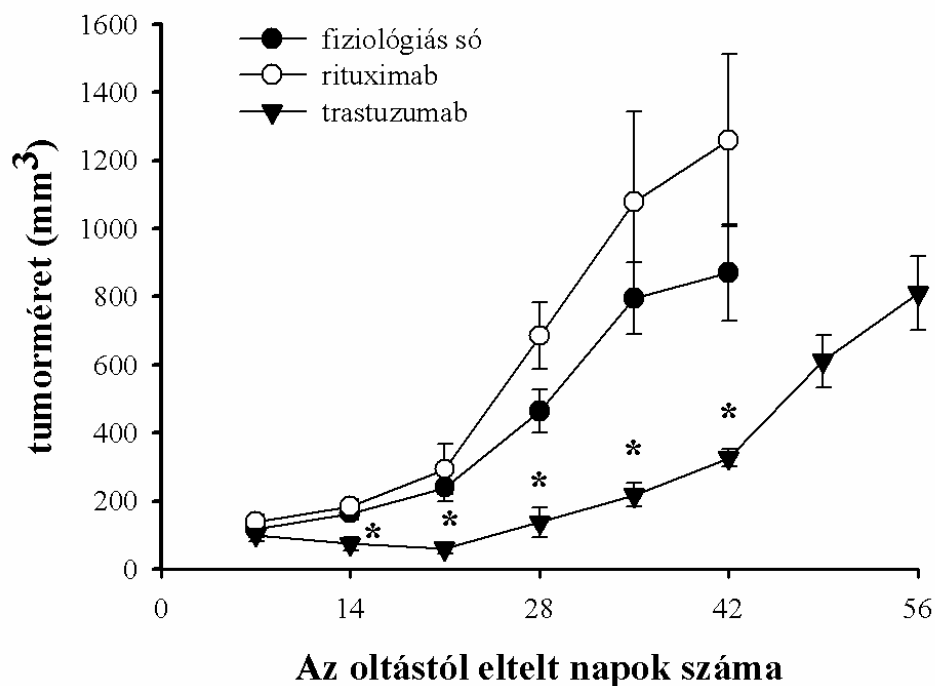
Rendszerünk alkalmasnak látszott az egerek vérében keringő daganatos sejtek kimutatására, így meg kívántuk vizsgálni, hogy vajon van-e hatása a trastuzumab-kezelésnek az egerek vérében keringő (és csontvelőjébe disszeminált) JIMT-1 sejtekre, akkor, amikor a primer daganat már rezisztens trastuzumabra.

5.11.1. A trastuzumab és a rituximab hatása a xenografttá még nem fejlődött JIMT-1 sejtekre

5×10^6 JIMT-1 sejtet oltottunk fiatal, nőstény SCID egerek bőre alá. Az egereket a daganatos sejtekkel való oltás napján kezdtük kezelni fiziológiás sóoldattal, trastuzumabbal vagy rituximabbal.

A trastuzumabnak a korábban megfigyeltekhez hasonló daganatnövekedést gátló hatása volt: a kísérlet 21. napjáig minden trastuzumabbal kezelt egérben (8 db) csökkent a daganat mérete, majd a 28. naptól exponenciálisan kezdtek növekedni a daganatok. A trastuzumab

20. ábra. A trastuzumab és a rituximab hatása a daganatnövekedésre *in vivo*



szignifikánsan gátolta a daganatnövekedést a 14. naptól a 42. napig (*, $P < 0.05$). Meglepetésünkre a rituximabbal kezelt egerekben jobban növekedtek a daganatok, mint a sóoldattal kezeltékben, jóllehet az eltérés nem volt szignifikáns (20. ábra, a nyilak a kezeléseket mutatják).

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

Amikor fenti kísérletünkben a daganatok térfogata elérte a $\sim 800 \text{ mm}^3$ -t (a sóoldattal és a rituximabbal^{aa} kezelt egerek esetén a kísérlet 42. napján, trastuzumab kezelésnél az 56. napon), kivéztettük az egereket és csontvelőt vettünk a combcsontjaikból. A vérből és a csontvelőből sűrűséggrádiens centrifugálással szeparált mononukleáris sejteket fluoreszcens festékhez kapcsolt humán ErbB1, ErbB2 és MHC-I ellenes monoklonális antitestek Fab fragmentumaival jelöltük (528-Fab, 2C4-Fab^{bb}, W6/32-Fab). Gyakran előfordul, hogy a daganatsejtekről hiányzik egy, a vizsgáló általi azonosításért felelős antigén. Ez téves negatív eredményhez vezethet. Sokkal kisebb annak a valószínűsége, hogy egyszerre 3 marker is hiányzik a sejtekről: ezért használtunk 3 különböző receptor ellen antitestet^{cc}.

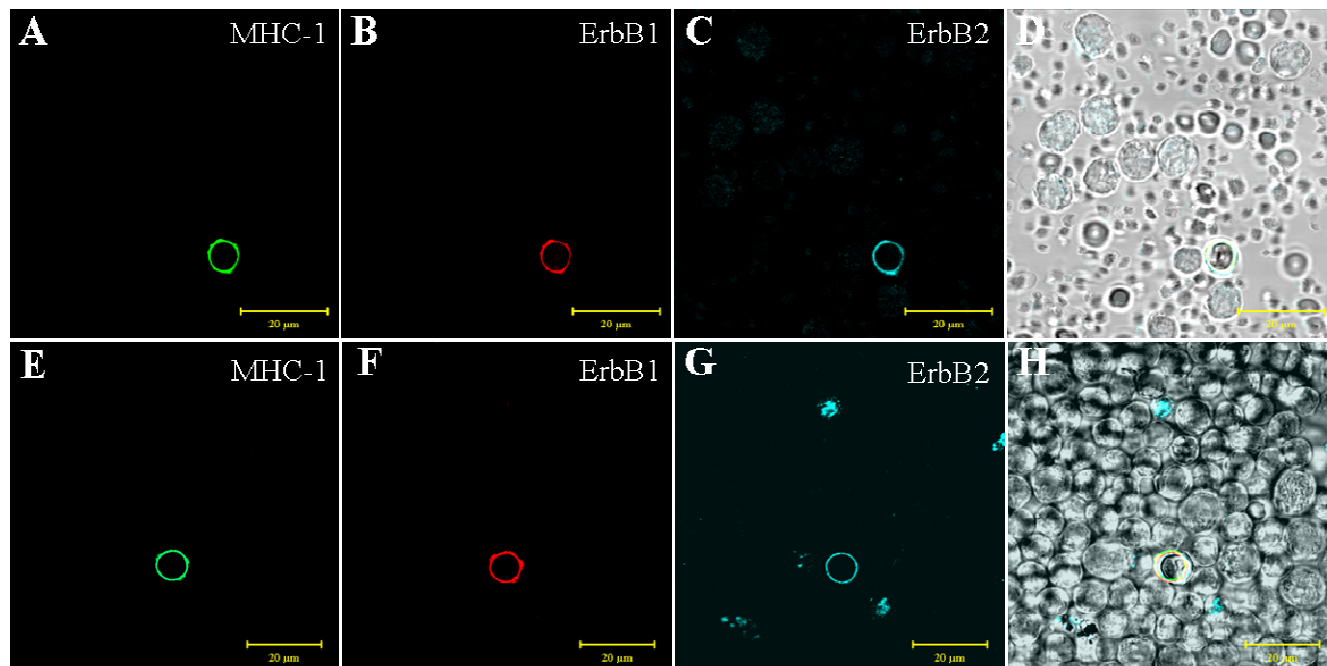
A sóoldattal, a rituximabbal és a trastuzumabbal kezelt egerekben is ki tudtunk mutatni VKDS-eket (21. ábra, A-D: azonos látótérrel készült képek, D: a transzmissziós kép és az A-C képek átfedése) és CSDDS-eket (21. ábra, E-H: azonos látótérrel készült képek, H: a transzmissziós kép és az E-G képek átfedése). Azonban míg minden sóoldattal (8/8) és rituximabbal (7/7) kezelt egérben voltak VKDS-ek és CSDDS-ek is, csak 8-ból 3 trastuzumabbal kezelt egér csontvelőjében és csak 8-ból 2 trastuzumabbal kezelt egér vérében találtunk daganatos sejteket (1. táblázat, 2. táblázat). A trastuzumab kezelés szignifikánsan csökkentette a VKDS-ek és a CSDDS-ek számát a sóoldattal kezelt egerekben találtakhoz képest (22. ábra, 1-2. táblázat, $P < 0.05$).

^{aa} A rituximabbal kezelt egerekben ennél nagyobb volt a daganatok térfogatának átlaga, lásd 53. oldalon.

^{bb} Az ErbB2 jelöléséhez használt 2C4 antitest nem kompetál a trastuzumabbal.

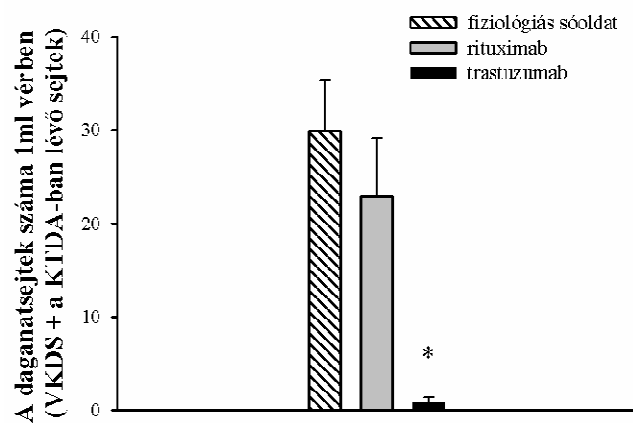
^{cc} Itt jegyzem meg, hogy minden általunk kimutatott daganatsejten volt MHC-I, ErbB1 és ErbB2 receptor is.

21. ábra. Vérben keringő és csontvelői, disszeminált daganatsejtek

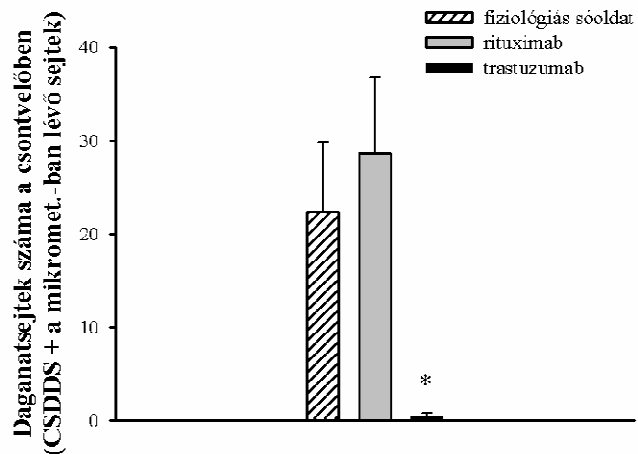


22. ábra. A trastuzumab-kezelés hatása a vérben keringő és csontvelői, disszeminált daganatsejtek számára

22/A. ábra



22/B. ábra



Érdekes, hogy míg a sóoldattal és a trastuzumabbal kezelt egerek csonvelőjében nem találtunk több daganatsejtből álló mikrometasztázisokat, 7-ből 5 rituximabbal kezelt egér csonvelőjében találtunk: 4 egérben egy-egy mikrometasztázist (3, 3, 3 ill. 6 sejtből álltak), egy egérben pedig hármat (6, 7 ill. 16 sejtből álltak) (23. ábra A-D: azonos látótérrel készült képek, D: az A-C képek átfedése). Sőt, az egyik rituximabbal kezelt egér vérében találtunk egy 9 sejtből álló keringő, többsejtes daganatsejt-aggregátumot (KTDA) (23. ábra E-F: azonos látótérrel készült képek, F: a transzmissziós kép és az E kép átfedése). Sem a sóoldattal, sem a trastuzumabbal kezelt egerek vérében nem találtunk KTDA-ot.

1. Táblázat. A vérben keringő daganatos sejtek száma (VKDS) 1ml vérben

kezelés	Sóoldat	rituximab	trastuzumab
VKDS-ek száma 1 ml vérben (egerenként)	40	20	0
	45	11	0
	32	9	3
	53	4	3
	20	32	0
	14	49	0
	11	35	0
	25		0
Átlag	30 ($\pm$ 5.3)	22.9 ($\pm$ 6.2)	0.75 ($\pm$ 0.5) ^a
ED:ÖE ^a	8/8	7/7	2/8

^a Egerek, amelyek vérében volt daganatsejt (ED) / összes egér az adott kezelésű alcsoportban (ÖE).

^a A trastuzumab kezelés szignifikánsan csökkentette a VKDS-ek számát ($p < 0.05$).

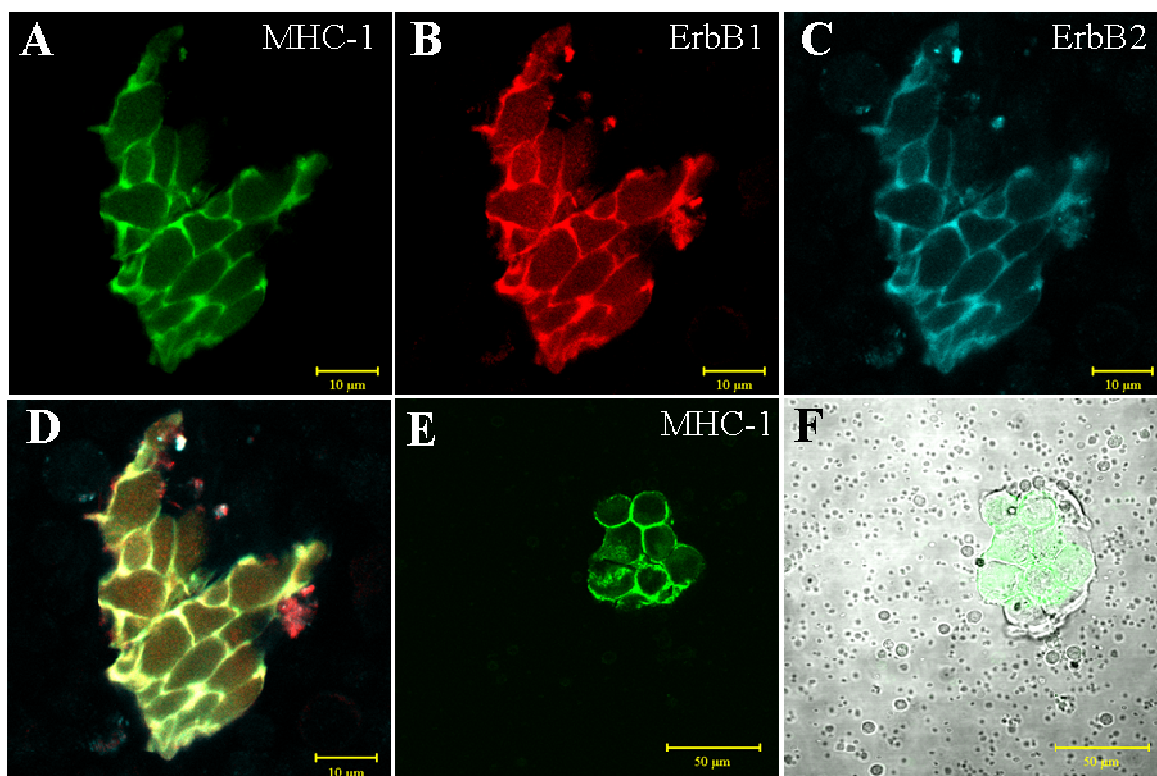
2. Táblázat. Csontvelői, disszeminált daganatsejtek (CSDDS) száma

kezelés	sóoldat	rituximab	trastuzumab
CSDDS-ek száma (egerenként)	8	17	0
	21	49	0
	27	8	2
	66	7	0
	7	16	1
	6	56	0
	7	48	1
	37		0
átlag	22.3 ($\pm$ 7.4)	28.7 ($\pm$ 8.1)	0.5 ($\pm$ 0.2) ^a
ED:ÖE ^a	8/8	7/7	3/8

^a Egerek, melyek csontvelőjében volt daganatsejt (ED) / összes egér az adott kezelésű alcsoportban (ÖE).

^a A trastuzumab kezelés szignifikánsan csökkentette a CSDDS-ek számát ($p < 0.05$).

23. ábra. Mikrometasztázis (A-D) és többsejtes daganatsejt-aggregátum (E-F) egy rituximabbal kezelt egérből



A kísérletünk negatív kontrolljának szánt rituximabbal kezelt egerekkel kapcsolatban 3 váratlan dolgot figyeltünk meg: a rituximabbal kezelt egerekben valamivel gyorsabban növekedtek a daganatok, mint a sóoldattal kezeltékben; csak a rituximabbal kezelt egerek csontvelőjében találtunk mikrometasztázisokat; csak egy rituximabbal kezelt egér vérében találtunk többsejtes tumoraggregátumot. Milyen szerepet játszott ebben a humán CD20 ellenes antitest, amelynek antigénje nincs jelen a JIMT-1 sejteken, az egér CD20 receptoraihoz pedig az egér és az ember CD20 receptora közti 16 aminosavnyi különbség miatt nem kötődik [105]? Jóllehet nem találtunk összefüggést a daganatméret és a VKDS-ek, CSDDS-ek vagy a mikrometasztázisok száma között, a legegyszerűbb (bár semmiféleképpen sem kielégítő) magyarázat arra, hogy a rituximab miért és hogyan növelhette a mikrometasztázisok és a KTDA-ok számát, mégis az, hogy a rituximabbal kezelt egerekben nagyobb volt a daganatméret ($1260 \pm 252 \text{ mm}^3$), mint a sóoldattal ($870 \pm 107 \text{ mm}^3$) vagy a trastuzumabbal ($810 \pm 142 \text{ mm}^3$) kezeltékben.

Persze a kérdés, hogy miért és hogyan növelte a primer daganatok méretét a rituximab, akkor is megválaszolatlan. Illetve egy őszinte válaszuk van: nem tudjuk.

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

Úgy gondoljuk, hogy az egyedülálló vagy a nem megfelelően érett daganatszövetű fejlődött JIMT-1 sejtek (in vitro sejtszuspenzió, kis daganatméretnél vagy a 0. napon kezdett trastuzumab-terápia, keringő/disszeminált daganatsejtek) érzékenyek a trastuzumab-közvetítette ADCC-re. Érett daganatszövetű fejlődve (későn kezdett trastuzumab terápia, 0. napon kezdett terápia 5-7. hetére kifejlődött rezisztencia) a sejtek elvesztik az érzékenységet, de azok a sejtek, amelyek kikerülnek a szöveti szerkezetből, újra érzékenyek lesznek (JIMT-1 X+ sejtek *in vitro* és *in vivo*, keringő és disszeminált daganatsejtek). Munkacsoportunk és mások is felvetették korábban, hogy egyes molekulák (MUC4 [62; 63], hialuronsav [64]) képesek lehetnek eltakarni az ErbB2 receptort, így a trastuzumab kevésbé fér hozzá. Mivel a JIMT-1 xenograftok sejtjeihez jól és egyenletesen kötődött a trastuzumab (gyorsfagyasztott metszetek jelölésével igazoltuk, lásd 18. ábra, folyamatos trastuzumab kezelés), úgy

gondoljuk, hogy a „maszkoló” molekulák az ErbB2-trastuzumab komplexet takarhatják el^{dd} az Fc receptorral rendelkező immunsejtek elől. Az epitéliális - mezenhimális átalakulás során a daganatsejtek elveszítik kötőszöveti és sejtes kapcsolataikat, sejtfelszíni receptormintázatuk jelentősen megváltozik. Ezáltal képessé válnak arra, hogy vándoroljanak és a keringésbe lépjenek, viszont, elgondolásunk szerint, az átalakulással megszűnik a trastuzumab Fc részének elrejtése az immunsejtek elől, így a sejtek a trastuzumab-kötött ErbB2-n keresztül újra érzékennyé válnak az ADCC-re.

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

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

A fenti elmélet alternatívája lehet az alábbi két, meglehet eddig hiányosan tárgyalt mechanizmus, amelyek megemlítése nélkül nem fejezhetem be a dolgozatomat.

Ismert, hogy a daganatok képesek immunszuppresszív mediátorokat termelni. Mimura és mksai leírták, hogy a TGF- β -t termelő sejtek ErbB2 pozitivitásuk ellenére jóval kisebb mértékben érzékenyek a trastuzumab-közvetítette sejtölésre, mint az ErbB2-t hasonló mértékben kifejező, de TGF- β -t nem termelő sejtek. TGF- β -t semlegesítő antitesttel való kezelés után az ellenálló sejtek érzékennyé váltak a trastuzumab-közvetítette sejtölésre [66]. Vajon a mi rendszerünkben nem hasonló mechanizmussal, az immunrendszer gyengítésével váltak ellenállóvá a daganatsejtek? Mindennek kielégítő bizonyítása kétféleképpen lehetséges: 1). ha JIMT-1 sejtekkel oltott egerekben ki tudnánk mutatni valamilyen, a daganatsejtek által termelt immunszuppresszív mediátort^{ee}, és ezen mediátor megjelenése egybeesne (ill. valamivel megelőzné) a trastuzumab-rezisztencia kialakulását; 2). ha a rezisztenssé vált

^{dd} Akár úgy, hogy csak az ErbB2-trastuzumab komplexet, akár úgy, hogy a sejt jóval nagyobb részét.

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

egerekből izolált immunsejtek *in vitro* kevésbé hatékonyan váltanának ki ADCC-t, mint a kontroll egerek immunsejtjei.

Megjegyzem, hogy az egerek immunrendszerének gyengülése/kimerülése ellen szól az a tény, hogy a trastuzumab képes volt a keringő és disszeminált daganatsejtek számát csökkenteni akkor, amikor a primer daganat már rezisztenssé vált.

A trastuzumab hatásmechanizmusában fontosnak tartják a komplement-közvetítette sejtölést (CDC) is. Clynes és mksai kísérletében az ép FcγR-ral rendelkező egerekben a trastuzumab meggátolta a trastuzumabra *in vitro* érzékeny BT474 sejtek növekedését, az FcγR-defektussal rendelkező egerekben viszont a növekedésgátló hatásának mintegy 2/3-át elveszítette [57]. Ebben a modell-rendszerben tehát a trastuzumab hatásának mintegy 2/3-áért az ADCC a felelős, a maradék 1/3-ért eddig a trastuzumab által az ErbB2-n keresztül kiváltott folyamatokat okoltuk: természetesen ebbe az 1/3-nyi részbe a CDC is beleszólhat. A CDC minden bizonnyal fontos volt a mi kísérleteinkben is, azonban az *in vitro* ADCC-t vizsgáló kísérleteink alapján úgy gondolom, hogy döntő szerepe az ADCC-nek volt^{ff}.

Végül szeretném még egyszer felhívni a figyelmet arra, hogy a trastuzumab olyan esetben csökkentette a keringő és disszeminálódott daganatsejtek számát, amikor a primer daganat növekedését már nem gátolta. Mindez felveti annak a lehetőségét, hogy a trastuzumab-kezelésnek kedvező hatása lehet olyan betegeknél is, akiknek a primer daganata rezisztens (legyen a rezisztencia akár intrinzik, akár szerzett) trastuzumab-kezelésre; különösen azt figyelembe véve, hogy a sejtciklus nyugvó fázisában lévő keringő/disszeminált daganatsejtekre a legtöbb kemoterápiás szer nem hat, [77; 78; 79], míg, ha ErbB2 pozitívak, a trastuzumab képes lehet ADCC-n keresztül az immunsejtekkel megöletni őket.

^{ff} Mindenesetre nem jelenthetjük ki, hogy rendszerünkben a trastuzumab *in vivo* hatásáért teljes mértékben az ADCC a felelős, mégha ezt jelen dolgozatban néhányszor, pongyolán, meg is tettem.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

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

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

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

^{hh} Természetesen az is nagyon fontos kérdés, hogy mi az oka a JIMT-1 sejtek direkt rezisztenciájának, munkacsoportunk vizsgálja ezt a kérdést; azonban jelen dolgozatnak nem ez a témája.

Kísérletünkben a trastuzumab szignifikánsan csökkentette a vérben keringő és a csontvelői disszeminált daganatos sejtek számát akkor, amikor a primer daganat már nem volt érzékeny a trastuzumab-kezelésre.

7. KÖSZÖNÖM

Végül szeretném megköszönni Szöllősi János, ifj. Vereb György, Nagy Péter, Pályi-Krekk Zsuzsanna, Fábíán Ákos, Horváth Gábor, Sebestyén Zsolt, Bacsó Zsolt, Fazekas Zsolt, Friedländer Elza, Tóth Enikő, Őri Gabriella, Pálné Terdik Tünde, Vágóné Toldi Hajnalka, Harangi Istvánné, Koós Zoltánné, Horváthné Pálfi Éva, Szentesi Gergelyné, Szilágyi Anikó (DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet), Jorma Isola, Minna Tanner, Päivikki Kauraniemi, Anita Kapanen, (Institute of Medical Technology, University and University Hospital of Tampere, Tampere, Finnország), Balázs Margit, Treszl Andrea, Rákossy Zsuzsa, Kovács Gyöngyné (DE OEC Megelőző Orvostani Intézet), id. Vereb György, Hunyadi Kálmánné (DE OEC Orvosi Vegytani Intézet), Juhász István, Szincsák Nóra, Bostyán Ferenc (DE OEC Bőr- és Nemikórtani Klinika), John W. Park (Division of Haematology/Oncology, Department of Medicine, University of California, San Francisco, Amerikai Egyesült Államok), Német Barbara, Vincze Katalin, Tirpák István, Ritz-Tirpák István (családom), valamint Mók Géza, Tagolób és Ormail Hendek (barátaim) segítségét.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. WHO, Fact sheet No. 297: Cancer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (2006).
2. G. Demonty, C. Bernard-Marty, F. Puglisi, I. Mancini, and M. Piccart, Progress and new standards of care in the management of HER-2 positive breast cancer. *Eur J Cancer* 43 (2007) 497-509.
3. D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, and W.L. McGuire, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987) 177-82.
4. D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, and et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (1989) 707-12.
5. S. Cohen, Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237 (1962) 1555-62.
6. J.E. de Larco, and G.J. Todaro, Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94 (1978) 335-42.
7. H. Ushiro, and S. Cohen, Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255 (1980) 8363-5.
8. J. Downward, Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M.D. Waterfield, Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307 (1984) 521-7.
9. S. Saule, M. Roussel, C. Lagrou, and D. Stehelin, Characterization of the oncogene (erb) of avian erythroblastosis virus and its cellular progenitor. *J Virol* 38 (1981) 409-19.
10. B.J. Druker, H.J. Mamon, and T.M. Roberts, Oncogenes, growth factors, and signal transduction. *N Engl J Med* 321 (1989) 1383-91.
11. A.L. Schechter, D.F. Stern, L. Vaidyanathan, S.J. Decker, J.A. Drebin, M.I. Greene, and R.A. Weinberg, The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312 (1984) 513-6.
12. G.D. Plowman, J.M. Culouscou, G.S. Whitney, J.M. Green, G.W. Carlton, L. Foy, M.G. Neubauer, and M. Shoyab, Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1746-50.
13. M.H. Kraus, W. Issing, T. Miki, N.C. Popescu, and S.A. Aaronson, Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor

- receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 9193-7.
14. Y. Yarden, and M.X. Sliwkowski, Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 127-37.
 15. A.W. Burgess, H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P. Garrett, D.J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward, and S. Yokoyama, An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12 (2003) 541-52.
 16. A. Citri, and Y. Yarden, EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (2006) 505-16.
 17. K.F. Lee, H. Simon, H. Chen, B. Bates, M.C. Hung, and C. Hauser, Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378 (1995) 394-8.
 18. M. Gassmann, F. Casagrande, D. Orioli, H. Simon, C. Lai, R. Klein, and G. Lemke, Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378 (1995) 390-4.
 19. D. Meyer, and C. Birchmeier, Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378 (1995) 386-90.
 20. D. Riethmacher, E. Sonnenberg-Riethmacher, V. Brinkmann, T. Yamaai, G.R. Lewin, and C. Birchmeier, Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389 (1997) 725-30.
 21. P.J. Miettinen, J.E. Berger, J. Meneses, Y. Phung, R.A. Pedersen, Z. Werb, and R. Derynck, Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376 (1995) 337-41.
 22. M. Sibilio, and E.F. Wagner, Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269 (1995) 234-8.
 23. R. Iwamoto, and E. Mekada, ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct Funct* 31 (2006) 1-14.
 24. X. Chen, G. Levkowitz, E. Tzahar, D. Karunagaran, S. Lavi, N. Ben-Baruch, O. Leitner, B.J. Ratzkin, S.S. Bacus, and Y. Yarden, An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/heregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4. *J Biol Chem* 271 (1996) 7620-9.
 25. D.C. Gamett, G. Pearson, R.A. Cerione, and I. Friedberg, Secondary dimerization between members of the epidermal growth factor receptor family. *J Biol Chem* 272 (1997) 12052-6.
 26. L. Sepp-Lorenzino, I. Eberhard, Z. Ma, C. Cho, H. Serve, F. Liu, N. Rosen, and R. Lupu, Signal transduction pathways induced by heregulin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncogene* 12 (1996) 1679-87.

27. D.B. Weiner, J. Liu, J.A. Cohen, W.V. Williams, and M.I. Greene, A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339 (1989) 230-1.
28. D. Harari, and Y. Yarden, Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19 (2000) 6102-14.
29. I. Alroy, and Y. Yarden, The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410 (1997) 83-6.
30. D.S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19 (1995) 183-232.
31. S. Paik, and E.T. Liu, HER2 as a predictor of therapeutic response in breast cancer. *Breast Dis* 11 (2000) 91-102.
32. S. Menard, P. Casalini, G. Tomasic, S. Pilotti, N. Cascinelli, R. Bufalino, F. Perrone, C. Longhi, F. Rilke, and M.I. Colnaghi, Pathobiologic identification of two distinct breast carcinoma subsets with diverging clinical behaviors. *Breast Cancer Res Treat* 55 (1999) 169-77.
33. M.E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P.N. Rao, and C.L. Sawyers, Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293 (2001) 876-80.
34. I.B. Weinstein, Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science* 297 (2002) 63-4.
35. D.W. Fry, A.J. Bridges, W.A. Denny, A. Doherty, K.D. Greis, J.L. Hicks, K.E. Hook, P.R. Keller, W.R. Leopold, J.A. Loo, D.J. McNamara, J.M. Nelson, V. Sherwood, J.B. Smaill, S. Trumpp-Kallmeyer, and E.M. Dobrusin, 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 (1998) 12022-7.
36. J. Bertram, M. Killian, W. Brysch, K.H. Schlingensiepen, and M. Kneba, 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 (1994) 661-7.
37. E. Song, P. Zhu, S.K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D.M. Dykxhoorn, Y. Feng, D. Palliser, D.B. Weiner, P. Shankar, W.A. Marasco, and J. Lieberman, Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 23 (2005) 709-17.
38. C.K. Tang, X.Z. Concepcion, M. Milan, X. Gong, E. Montgomery, and M.E. Lippman, 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 (1999) 5315-22.

39. J.K. Batra, P.G. Kasprzyk, R.E. Bird, I. Pastan, and C.R. King, Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 5867-71.
40. M.L. Disis, and M.A. Cheever, HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv Cancer Res* 71 (1997) 343-71.
41. R.M. Hudziak, G.D. Lewis, M. Winget, B.M. Fendly, H.M. Shepard, and A. Ullrich, p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9 (1989) 1165-72.
42. M. Pegram, and D. Slamon, Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 27 (2000) 13-9.
43. P. Carter, L. Presta, C.M. Gorman, J.B. Ridgway, D. Henner, W.L. Wong, A.M. Rowland, C. Kotts, M.E. Carver, and H.M. Shepard, Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 4285-9.
44. M. Pegram, S. Hsu, G. Lewis, R. Pietras, M. Beryt, M. Sliwkowski, D. Coombs, D. Baly, F. Kabbinavar, and D. Slamon, Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18 (1999) 2241-51.
45. M. Pegram, Molecular determinants of trastuzumab response/resistance. American Association for Cancer Research, Education Book (2005).
46. D.J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344 (2001) 783-92.
47. J. Baselga, Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur J Cancer* 37 Suppl 1 (2001) 18-24.
48. A. Lin, and H.S. Rugo, The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 8 (2007) 47-60.
49. R. Nahta, and F.J. Esteva, Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 232 (2006) 123-38.
50. R. Nahta, D. Yu, M.C. Hung, G.N. Hortobagyi, and F.J. Esteva, Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3 (2006) 269-80.
51. M. Cuello, S.A. Ettenberg, A.S. Clark, M.M. Keane, R.H. Posner, M.M. Nau, P.A. Dennis, and S. Lipkowitz, 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 (2001) 4892-900.

52. P. Nagy, A. Jenei, S. Damjanovich, T.M. Jovin, and J. Szolosi, Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 5 (1999) 255-71.
53. M.X. Sliwkowski, J.A. Lofgren, G.D. Lewis, T.E. Hotaling, B.M. Fendly, and J.A. Fox, Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26 (1999) 60-70.
54. H.A. Lane, A.B. Motoyama, I. Beuvink, and N.E. Hynes, Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling. *Ann Oncol* 12 Suppl 1 (2001) S21-2.
55. K. Kono, E. Sato, H. Naganuma, A. Takahashi, K. Mimura, H. Nukui, and H. Fujii, Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 2538-44.
56. Y. Izumi, L. Xu, E. di Tomaso, D. Fukumura, and R.K. Jain, Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416 (2002) 279-80.
57. R.A. Clynes, T.L. Towers, L.G. Presta, and J.V. Ravetch, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6 (2000) 443-6.
58. F.J. Esteva, V. Valero, D. Booser, L.T. Guerra, J.L. Murray, L. Pusztai, M. Cristofanilli, B. Arun, B. Esmali, H.A. Fritsche, N. Sneige, T.L. Smith, and G.N. Hortobagyi, Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (2002) 1800-8.
59. A.B. Motoyama, N.E. Hynes, and H.A. Lane, The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62 (2002) 3151-8.
60. Y. Lu, X. Zi, and M. Pollak, Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer* 108 (2004) 334-41.
61. F.M. Yakes, W. Chinratanalab, C.A. Ritter, W. King, S. Seelig, and C.L. Arteaga, 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 (2002) 4132-41.
62. S.A. Price-Schiavi, S. Jepson, P. Li, M. Arango, P.S. Rudland, L. Yee, and K.L. Carraway, Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* 99 (2002) 783-91.
63. P. Nagy, E. Friedlander, M. Tanner, A.I. Kapanen, K.L. Carraway, J. Isola, and T.M. Jovin, Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65 (2005) 473-82.
64. Z. Palyi-Krek, M. Barok, J. Isola, M. Tammi, J. Szollosi, and P. Nagy, Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* (2007).

65. Y. Nagata, K.H. Lan, X. Zhou, M. Tan, F.J. Esteva, A.A. Sahin, K.S. Klos, P. Li, B.P. Monia, N.T. Nguyen, G.N. Hortobagyi, M.C. Hung, and D. Yu, PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6 (2004) 117-27.
66. K. Mimura, K. Kono, M. Hanawa, M. Kanzaki, A. Nakao, A. Ooi, and H. Fujii, Trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 4898-904.
67. K. Kono, A. Takahashi, F. Ichihara, H. Sugai, H. Fujii, and Y. Matsumoto, Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 62 (2002) 5813-7.
68. T. Kute, C.M. Lack, M. Willingham, B. Bishwokama, H. Williams, K. Barrett, T. Mitchell, and J.P. Vaughn, Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 57 (2004) 86-93.
69. M. Tanner, A.I. Kapanen, T. Junttila, O. Raheem, S. Grenman, J. Elo, K. Elenius, and J. Isola, Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 3 (2004) 1585-92.
70. T.P. Butler, and P.M. Gullino, Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 35 (1975) 512-6.
71. Y.S. Chang, E. di Tomaso, D.M. McDonald, R. Jones, R.K. Jain, and L.L. Munn, Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 14608-13.
72. K.J. Luzzi, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers, and A.C. Groom, Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153 (1998) 865-73.
73. N. Hanna, Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1 (1982) 45-64.
74. M.E. Key, Macrophages in cancer metastases and their relevance to metastatic growth. *Cancer Metastasis Rev* 2 (1983) 75-88.
75. L. Weiss, The biomechanics of cancer cell traffic, arrest, and intravascular destruction. *Microcirculation in Cancer Metastasis*. Edited by Orr FW Buchanan MR Weiss L, Boca Raton, FL, CRC Press, Boca Raton (1991) 131-144.
76. P. Paterlini-Brechot, and N.L. Benali, Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253 (2007) 180-204.
77. S. Braun, C. Kentenich, W. Janni, F. Hepp, J. de Waal, F. Willgeroth, H. Sommer, and K. Pantel, Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 18 (2000) 80-6.

78. N. Xenidis, I. Vlachonikolis, D. Mavroudis, M. Perraki, A. Stathopoulou, N. Malamos, C. Kouroussis, S. Kakolyris, S. Apostolaki, N. Vardakis, E. Lianidou, and V. Georgoulis, Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann Oncol* 14 (2003) 849-55.
79. A.F. Chambers, Dormancy and Growth of Tumor Cells in Ectopic Sites. *Am Assoc Cancer Res Educ Book* Apr (2006) 120 - 125.
80. S.W. Duffy, L. Tabar, B. Vitak, and J. Warwick, Tumor size and breast cancer detection: what might be the effect of a less sensitive screening tool than mammography? *Breast J* 12 Suppl 1 (2006) S91-5.
81. L. Tabar, and P.B. Dean, Mammography and breast cancer: the new era. *Int J Gynaecol Obstet* 82 (2003) 319-26.
82. M. Cristofanilli, G.T. Budd, M.J. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, M.C. Miller, J.M. Reuben, G.V. Doyle, W.J. Allard, L.W. Terstappen, and D.F. Hayes, Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351 (2004) 781-91.
83. M. Cristofanilli, D.F. Hayes, G.T. Budd, M.J. Ellis, A. Stopeck, J.M. Reuben, G.V. Doyle, J. Matera, W.J. Allard, M.C. Miller, H.A. Fritsche, G.N. Hortobagyi, and L.W. Terstappen, Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23 (2005) 1420-30.
84. N. Xenidis, M. Perraki, M. Kafousi, S. Apostolaki, I. Bolonaki, A. Stathopoulou, K. Kalbakis, N. Androulakis, C. Kouroussis, T. Pallis, C. Christophylakis, K. Argyraki, E.S. Lianidou, S. Stathopoulos, V. Georgoulis, and D. Mavroudis, Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 24 (2006) 3756-62.
85. S. Braun, F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and K. Pantel, A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 353 (2005) 793-802.
86. P. Friedl, and K. Wolf, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 362-74.
87. J.J. Christiansen, and A.K. Rajasekaran, Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 66 (2006) 8319-26.
88. P. Wulfing, J. Borchard, H. Buerger, S. Heidl, K.S. Zanker, L. Kiesel, and B. Brandt, HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12 (2006) 1715-20.
89. V. Bozionellou, D. Mavroudis, M. Perraki, S. Papadopoulos, S. Apostolaki, E. Stathopoulos, A. Stathopoulou, E. Lianidou, and V. Georgoulis, Trastuzumab

- administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 8185-94.
90. M.J. Bosma, and A.M. Carroll, The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9 (1991) 323-50.
91. G.C. Bosma, M. Fried, R.P. Custer, A. Carroll, D.M. Gibson, and M.J. Bosma, Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. *J Exp Med* 167 (1988) 1016-33.
92. E.M. Pantelouris, Athymic development in the mouse. *Differentiation* 1 (1973) 437-50.
93. M.E. Gershwin, B. Merchant, M.C. Gelfand, J. Vickers, A.D. Steinberg, and C.T. Hansen, The natural history and immunopathology of outbred athymic (nude) mice. *Clin Immunol Immunopathol* 4 (1975) 324-40.
94. C.I. Spiridon, S. Guinn, and E.S. Vitetta, A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F(ab')₂ fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies. *Clin Cancer Res* 10 (2004) 3542-51.
95. M. Edidin, and T. Wei, Lateral diffusion of H-2 antigens on mouse fibroblasts. *J Cell Biol* 95 (1982) 458-62.
96. P.M. Smith-Jones, D.B. Solit, T. Akhurst, F. Afroze, N. Rosen, and S.M. Larson, Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors. *Nat Biotechnol* 22 (2004) 701-6.
97. J. Szollosi, S. Damjanovich, M. Balazs, P. Nagy, L. Tron, M.J. Fulwyler, and F.M. Brodsky, Physical association between MHC class I and class II molecules detected on the cell surface by flow cytometric energy transfer. *J Immunol* 143 (1989) 208-13.
98. J. Szollosi, L. Matyus, L. Tron, M. Balazs, I. Ember, M.J. Fulwyler, and S. Damjanovich, Flow cytometric measurements of fluorescence energy transfer using single laser excitation. *Cytometry* 8 (1987) 120-8.
99. Z. Rakosy, L. Vizkeleti, S. Ecsedi, Z. Voko, A. Begany, M. Barok, Z. Krekk, M. Gallai, Z. Szentirmay, R. Adany, and M. Balazs, EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 121 (2007) 1729-37.
100. J. Szollosi, M. Balazs, B.G. Feuerstein, C.C. Benz, and F.M. Waldman, ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 55 (1995) 5400-7.
101. C.I. Spiridon, M.A. Ghetie, J. Uhr, R. Marches, J.L. Li, G.L. Shen, and E.S. Vitetta, Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 1720-30.
102. D. Flieger, R. Gruber, G. Schlimok, C. Reiter, K. Pantel, and G. Riethmuller, A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 180 (1995) 1-13.

103. J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267 (2000) 5421-6.
104. R.C. Gonzalez, R.E. Woods, and S.L. Eddins, Segmentation using the watershed transform. In: *Digital image processing using Matlab*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall: 2004 p. 417–425.
105. M.J. Polyak, and J.P. Deans, Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure. *Blood* 99 (2002) 3256-62.
106. C. Cheers, and R. Waller, Activated macrophages in congenitally athymic "nude mice" and in lethally irradiate mice. *J Immunol* 115 (1975) 844-7.
107. M. Hasui, Y. Saikawa, M. Miura, N. Takano, Y. Ueno, A. Yachie, T. Miyawaki, and N. Taniguchi, Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency (scid) and athymic (nude) mice. *Cell Immunol* 120 (1989) 230-9.
108. B. Leyland-Jones, K. Gelmon, J.P. Ayoub, A. Arnold, S. Verma, R. Dias, and P. Ghahramani, Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol* 21 (2003) 3965-71.
109. M.L. Thomas, The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7 (1989) 339-69.
110. J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C.D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D.M. Rothstein, and J.M. Penninger, CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409 (2001) 349-54.

9. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezéshez felhasznált közlemények

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

Egyéb közlemények

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

Absztraktok

1. Pályi-Krek 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. **Barok M.**, Juhász I., Balázs M., Park J. W., Isola J., Fazekas Z., Vereb Gy., Szöllősi J.: Herceptin® resistant breast cancer xenografts can be influenced by early trastuzumab treatment. FEBS Journal 272: 302-302 Suppl. 1, Jul. 2005.
3. **Barok M.**, Szincsik N., Treszl A., Balázs M., Vereb Gy., Szöllősi J.: Examination of a Herceptin resistant breast cancer cell line in SCID mouse model. 3rd Hungarian Cell Analysis Conference, 16-18 May 2002. Budapest, Hungary, Cytometry, 2003. 56A, Number2, 127.
4. Sebestyén Zs., Krek 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.
5. Nagy P., Jenei A., Kirsch A. K., Balogh L., **Barok M.**, Damjanovich S., Jovin TM., Szöllősi J.: Small and large scale clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase on quiescent and stimulated cells detected by scanning near-field optical microscopy. Cytometry 42 (2): 152-152 Apr. 15. 2000.

Előadások és poszterek

1. Az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) szerepe a trastuzumab hatásmechanizmusában. A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság Immunfarmakológiai Szekciójának és a Debreceni Akadémiai Bizottság Kísérletes Farmakológiai Munkabizottságának tudományos ülése, 2006. 12. 12., (előadás)
2. Szemléletváltás a Herceptin-rezisztencia kérdésében? V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2006., (poszter)

3. Korai Herceptin® terápia Herceptin® rezisztens emlőrák xenograftokban. A Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Debrecen, 2005. június 26-29., (poszter)
4. Herceptin® resistant breast cancer xenografts can be influenced by early trastuzumab treatment. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, 2-7 July 2005; Budapest, Hungary, (poszter)
5. Detection of circulating micrometastasis in Herceptin® resistant breast cancer xenografts. EACR 18, 3-6 July 2004, Innsbruck, Austria, (poszter)
6. Mikrometasztázisok kimutatása Herceptin® rezisztens és érzékeny emlőrák xenograftokban. IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2004., (poszter)
7. Herceptin® rezisztens emlőtumor sejtvonal vizsgálata SCID egér modellben. III. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2002., (poszter)

**10. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**