

Válasz Dr. Kulka Janina egyetemi tanár bírálatára:

Először köszönetemet szeretném kifejezni, hogy MTA doktori munkám bírálatát elvállalta és azt pozitívan értékelte. Köszönöm, hogy a formai hibákra felhívta figyelmemet, az elektronikus változatban kijavítottam őket. A tudományos kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1. *...milyen további eredmények várhatók az olyan új technikák alkalmazásától, mint pl. Nanopipette, AFM, scanning ion conductance microscopy, dynamic single molecule co-localisation?*

Az élő sejteken található receptor klasztereket vizsgáló eljárásokkal szemben követelményként elvárható, hogy legyen nagy felbontású, specifikus (tehát a vizsgálni kívánt molekulát azonosítani lehessen) és non-invazív. Ezen elvárásoknak a legtöbb ma széleskörűen alkalmazott módszer nem felel meg, hiszen pl. az elektronmikroszkóp nagy felbontású, de destruktív, az AFM szintén nagy felbontású, de a vizsgálni kívánt molekula azonosítása problémába ütközik a membrán felszínén. De több területen elindultak olyan fejlesztések, melyek a fenti követelményeknek eleget tesznek:

- a. fejlesztések a fluoreszcens mikroszkópia területén: a fluoreszcens mikroszkóp specifikus és nem destruktív, de feloldóképessége korlátozott (kb. 200 nm). Ezt az utóbbi időben a szuper-feloldóképességű eljárások (mint pl. STED (stimulated emission depletion microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) jelentősen javították, bár a rutinszerű egyedi molekula feloldás még mindig nehezen elérhető.
- b. fejlesztések a pásztázó szondás mikroszkópiák (scanning probe microscopy, SPM) területén: az SPM eljárások általában magas, akár az elektronmikroszkópét megközelítő feloldóképességgel rendelkeznek, de specificitásuk korlátozott volt. Ezen a területen jelent előrelépést az SPM technikák kombinálása valami más modalitással (Am J Physiol Heart Circ Physiol 304:H1-H11, 2013), pl. a pásztázó ion konduktancia mikroszkóp patch clamppal való egyesítése, amikor a csatornák egyedi konduktanciájának mérése kombinálható az 50-100 nm-es feloldású topográfiai képpel. Ugyanez az eljárás alkalmazható receptorok lokális stimulációjára is, amikor a membránreceptoroknak csak egy kis hányada aktiválódik (Science 327, 1653, 2010). Hasonlóképpen, ha az AFM szondához biológiailag releváns anyagot kötnek, akkor annak interakciója a sejtfelszínnel vizsgálható (chemical force microscopy). Ha a nanopipetta végéhez kalmodulint kötnek, a kalmodulin-Ca²⁺ kötődés affinitása vizsgálható.
- c. fejlesztések az egyedi molekula követés (single molecule tracking) területén: a fluorofórral jelölt sejtfelszíni molekulák követésében az új típusú jelölő anyagok (pl. kvantum dot) alkalmazása, ill. a mozgási pályák követésére kidolgozott új algoritmusok jelentik a jelentősebb előrelépést. Ezen technikákat akár két színű jelölésre is lehet alkalmazni, amikor is a receptorok dimerizációja is nyomon követhető (pl. Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9). A kérdésben felvetett „dynamic single molecule colocalization, DySCo) is egy hasonló technika.

Az erre a kérdésre adott válasz összegzéseként elmondható, hogy azon technikák, melyek a funkcionalitást, a dinamikus képzést a magas feloldóképességgel

kombinálják, jelentősen több belátást engednek majd a receptor klaszterek szerveződésébe és működésébe élő sejteken.

2. *...mi az oka, hogy intraperitoneálisan oltották az állatokat? Relevánsak-e az eredmények a humán intravénás adagolás ismeretében?*

A Herceptint embereknek leginkább intravénásan adják, de az egerek intravénás oltása, leginkább az állatok kis mérete miatt, rendkívül nehézkes. Ezért használják a kísérleti állatok oltására az intraperitoneális módot széleskörűen. Ez a legtöbb esetben jó közelítése az intravénás adagolásnak, hiszen a „bioavailability” monoklonális antitestek intraperitoneális oltásánál ~80%-os (Br J Clin Pharmacol. 69(6): 617–625). Intraperitoneális oltásnál az antitest 5-10 óra alatt eléri el a csúcskoncentrációt a vérben (J Nucl Med. 2003;44(7):1148-55.) és ott hosszú félélettíddel jellemezhető (emberben 28 nap, Curr Clin Pharmacol. 2008;3(1):51-55). A nagyon lassú elimináció miatt a lassú felszívódás a peritoneális üregből valószínűleg nem jelentős probléma, hiszen a vérben az egyensúlyi koncentrációt a felszívódás és az elimináció sebességeinek különbsége szabja meg (a megoszlási térfogat mellett). A fentiek miatt úgy gondolom, hogy a farmakokinetikában levő kis eltérések ellenére az egerek intraperitoneális oltása jó közelítése a humán terápiában használt intravénás adagolásnak, ezért eredményeink relevánsak a klinikai gyakorlat szempontjából is.

3. *...a heterogenitást mennyire lehet észlelni és vizsgálni sejtvonalakon?*

Az intratumor heterogenitás tényleg nagyon fontos probléma, amit sejtvonalakkal csak korlátozottan lehet modellezni. A heterogenitás létrejöttét egy homogén monoklonális populációból a sejt plaszticitása (mutációk, szabályozási folyamatok) teszi lehetővé, és az erőforrásokért (tápanyag, növekedési faktorok) és a túlélésért folytatott verseny teszi szükségessé. A heterogenitás genetikai és epigenetikai okokra vezethető vissza. Mindkettő jelen van sejtvonalakban is (Phys Biol 2012;9(6):065005), de mivel sejtvonalak esetében a tumor sejteknek kevésbé kell versengeni a túlélésért, mint *in vivo*, ezért az *in vitro* tapasztalható heterogenitás csak gyenge modellrendszere az *in vivo* helyzetnek. Egy kicsit javul a helyzet, ha a tumorsejtvonalat egérbe oltjuk, de még ez sem tekinthető a humán daganatokban tapasztalható helyzet tökéletes másának, hiszen

- az egerek tipikusan immundeficiensek
- a humán tumorsejtek az egér kötőszövetével kevésbé tudnak együttműködni. Ismert, hogy a tumor-kötőszövet interakciók kulcsfontosságúak a tumor progresszió szempontjából (Histochem Cell Biol 2008;130(6):1091-103.).

Ennek ellenére xenotranszplantált tumor sejtvonalakban jól elkülöníthetőek a tumoros őssejtek és más alpopulációk (Nature 488:522-526; Nature 488:527-530), de a heterogenitás mértéke elmarad a humán daganatokban tapasztalttól, ahol mind a primer tumoron belül, mind a metasztázis képzés folyamán igen nagymértékű heterogenitás alakul ki.

4. *...lehet-e szerepe a JIMT-1 sejtvonal trastuzumab rezisztenciájában a PIK3CA mutációnak, a PTEN alacsony és a neuregulin-1 magas expressziójának?*

A trastuzumab rezisztencia kialakulása rendkívül sokféle mechanizmusra vezethető vissza, mint azt az MTA doktori dolgozatomban is tárgyaltam. A rezisztencia mechanizmusok között szerepel a PTEN hiányzó expressziója és a PI3K katalitikus

alegységének kináz aktivitást fokozó mutációja. Így ezek valójában hozzájárulhatnak a JIMT-1 sejtvonal trastuzumab rezisztenciájához, hasonlóan a fokozott neuregulin-1 expresszióhoz. A fenti okfejtés elsősorban *in vitro* körülményekre vonatkozik, hiszen *in vivo* körülmények között a trastuzumab részben (más vélemények szerint szinte kizárólagosan) az ADCC reakción keresztül fejti ki hatását. A mi kísérleti rendszerünkben

- a trastuzumab kizárólag ADCC (vagy CDC, azaz komplement dependens citotoxicitás) reakció segítségével hatott, hiszen Fc rész mentes trastuzumab-F(ab)₂-nek nem volt hatása (Mol Cancer Ther 2007;6(7):2065-72).
- a trastuzumab rezisztencia kialakulása kb. 5 hetet vett igénybe, tehát az inokuláció után azonnal trastuzumabbal kezelt sejtek még válaszoltak az antitestre.

A fenti két ok miatt véleményem szerint a JIMT-1 sejtvonal *in vivo* rezisztenciájáért inkább a maszkírozás felelős.

5. *...befolyásolja-e a trastuzumab vagy más ErbB2 ellenes, molekulárisan célzott szer hatását az, hogy az ErbB2 milyen heteroasszociátumban van jelen?*

Ha elfogadjuk, hogy a trastuzumab elsősorban ADCC révén hat, akkor az ErbB2-vel heteroasszociáló molekulák csak akkor befolyásolják az antitest hatását, ha maszkírozzák az ErbB2-t. Az ErbB2 heterodimerizációját gátló pertuzumab és az ErbB2 tirozin kináz aktivitását gátló kis molekulású inhibitorok hatékonyságát viszont csökkenthetik az ErbB2-vel heteroasszociálódó molekulák. Mivel azonban az ErbB jelátviteli hálózat központja az ErbB2, a legfontosabb molekula gátlását egyéb ErbB fehérjék expressziója kevésbé tudja ellensúlyozni. Ezért az állítás inkább fordított irányban igaz: az ErbB1-re specifikus inhibitorok hatását sokkal lényegesebben csökkenti az ErbB2 magas expressziója, esetleg mutációja (pl. Cancer Cell, 2006;10(1):25-38). Ezt alátámasztja az is, hogy a klinikumban elterjedt ErbB2 tirozin kináz inhibitor (lapatinib) az ErbB1-et is gátolja, így az ErbB1 fokozott expressziója nem lehet a rezisztencia oka (ErbB3-nak nincs kináz aktivitása, az ErbB4 jelentősége kevésbé dokumentált humán daganatokban). Tehát elképzelhető, hogy az ErbB receptorok heteroasszociációs partnereinek fokozott expressziója csökkenti a célzott terápiák hatékonyságát, de legtöbb esetben teljesen más jelátviteli útvonalak aktiválódása (pl. Met) szokott a rezisztencia mögött állni.

6. *...volt-e K-Ras mutáció a vizsgált sejtvonalakban és ha igen, ez befolyásolhatta-e a gyógyszeres kísérletek eredményeit?*

Tudomásom szerint az általam használt sejtvonalakban nem volt mutáns K-Ras (Mol Cancer Res. 2007;5:195-201; Cancer Lett. 2010;294:211-219). Ennek egyik lehetséges oka az, hogy a K-Ras mutáció leginkább colon, tüdő és pancreas tumorokban fordul elő (J Biomed Biotechnol. 2010;2010:150960), és a használt sejtvonalak között nem volt ilyen eredetű. Egyébként mind az elisidepsin, mind a trastuzumab hatását elvileg befolyásolhatja a mutáns K-Ras jelenléte. Bár tudomásom szerint a mutáns K-Ras és a trastuzumab hatásossága között még nem találtak összefüggést, előbbi állításomat arra alapozom, hogy az EGFR ellenes antitestekkel kapcsolatban már kimutatták, hogy a receptor expresszió csökkentésével a mutáns K-Ras csökkenti hatékonyságukat (Neoplasia. 2012;14:190-205). Az elisidepsin és a mutáns K-Ras közötti kapcsolatról szintén nincs tudomásom, de ezen gyógyszer hatékonysága és az

Akt expresszió között már találtak negatív korrelációt (Mol Pharmacol. 2005;68:502-10), így a K-Ras hatása sem elképzelhetetlen.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni, hogy MTA doktori disszertációmát kedvezően értékelte.

Nagy Péter