

OTKA T048933/ Kotlán Beatrix/
Tumorspecifikus ellenanyagfragmens tisztítási és tesztelési eljárásainak kidolgozása a
diagnosztikus alkalmazhatóság céljából.

A tématerv megvalósításának háttere:

A malignus transzformáció következtében megváltozott tulajdonságú sejteket specifikusan jellemző sejtfelszíni és egyéb célmolekulák meghatározása a tumor diagnosztikus és terápiás lehetőségek kulcsfontosságú alapja. A tumorok kialakulásában, felismerésében és eliminálásában a gazdaszervezet immunrendszere sokféle módon közrejátsszik. A szolid tumorokban felhalmozódó immunkompetens sejtek feltételezhetően értékes „információval rendelkeznek” a tumorok vonatkozásában, esetleg akár többel, mint a perifériás vér és a nyirokcsomók sejtselemei. A tumorszövetet infiltráló immunsejtek (TIL, tumor infiltrating lymphocytes) legnagyobb része T sejt, amelyekkel széles körben foglalkoztak már különösen melanomák esetében. A humorális immunrendszer fő sejtjeit a tumorok vonatkozásában azonban az utóbbi évekig elhanyagolták, mivel nem vagy csak alig kimutatható mennyiségben lehetett hagyományos módszerekkel kimutatni őket. *A korábbi és jelen OTKA tématervi munkám ezen tumort infiltráló B sejtek (TIL-B) jelentőségére és több irányban felhasználható kapacitására hívja fel a figyelmet.* A szelektív tumorsejtfelismerés, tumor sejt kimutatás és eliminálás problémaköréhez várakozásunknak megfelelően remélhetően nagy lendületet adnak majd jelen nemzetközileg és hazailag is úttörő kutatásaink.

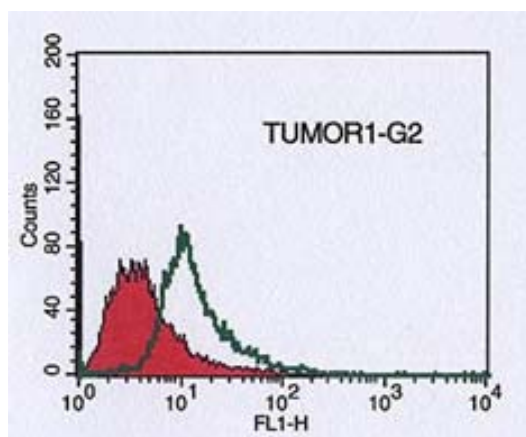
A tématerv kísérletes kivitelezése a célkitűzéseknek megfelelően több párhuzamos szálon futott. A munka sokféle új módszertani folyamatra épült, amelyek beállítása, értékelése és a preparatív és analitikai lépések precíziós és sok párhuzamosban megvalósítandó volta miatt sok időt és pénzt igényeltek. *A téma eredményei nem szokványos feltételek között zajlottak,* mivel erre az időszakra esik egy *intézet szintű munkahelymegszűnés* (OGYK mint első befogadó intézmény megszűnése), ami már előzetesen is problémás munkahelyzetet teremtett. Szerencsére a *szervezetileg együttműködő új befogadó intézmény (OOI) nagyon segítőleg állt a téma folytatását biztosító feladatok lebonyolításához* és a körülményekhez mért munkafeltételek megteremtéséhez. Nem kis feladat és igen időigényesnek bizonyult a mélyfagyasztott preparátumok, használműszer és egyéb a kísérletekhez elengedhetetlen felhasználandó anyagok munkához való helyi átcsoportosításának megvalósítása, a hivatalos engedélyeztetések, az *új befogadó intézményben való megfelelő laborberendezés és munkafolyamatok beállítása.* Az új körülmények új feltételeket jelentettek, amihez alkalmazkodnom kellett és *új lehetőségeket is teremtettek, amit igyekeztem a munka javára fordítani.*

A tématerv eredményei a célkitűzéseknek lényegét tekintve megfelelnek, bár egyes fázisokat át kellett csoportosítanom, kissé módosítanom illetve sok esetben jelentős bővítésre kerülhetett sor. A munka alakulásáról, a körülményekhez adaptálódó szükséges változtatásokkal kapcsolatban az OTKA iroda vezetését folyamatosan tájékoztattam, illetve kérvényeztem bizonyos szükséges módosításokat (Befogadó intézmény változás, használt műszer felhasználás, új feltételekhez mért beszerzés változtatási igény, pénzkeret átcsoportosítás a tématerv eredményeinek továbbvitele és hasznosíthatóságának lehetősége érdekében).

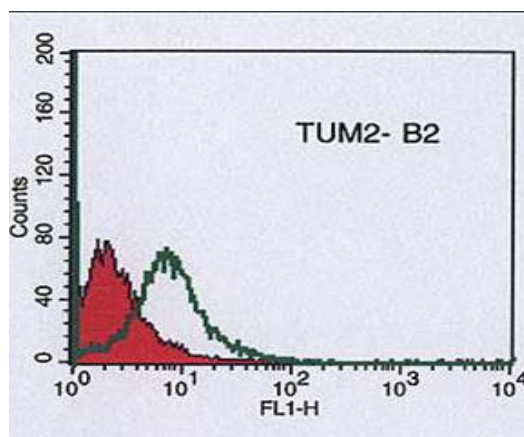
A kapott eredmények összesített bemutatása:

A jelen tématerv az előző munkáink során nyert humán tumorreaktív ellenanyag fragmens (Ref. 1, 2) további jellemzését és diagnosztikus felhasználhatóságához szükséges megfelelő tisztítási és konjugációs lépések valamint visszatesztelési rendszerek kidolgozását célozta.

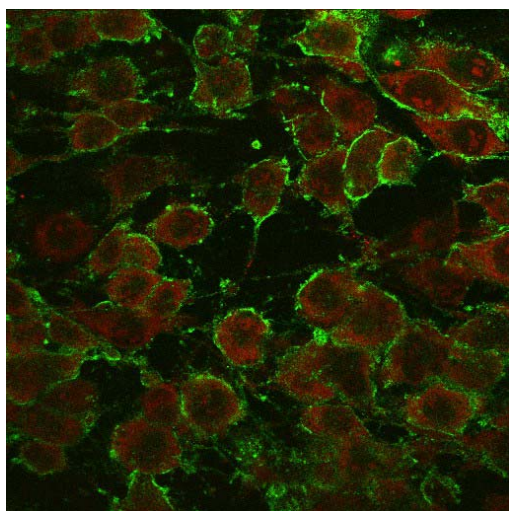
1. Az első időszakban ***a korábban kiválasztott anti GD3 gangliozid specificitású egyláncú ellenanyag fragmens (scFv) klónokon dolgoztam tovább.*** A teljes scFv (VH-linker-V κ) és a rövid scFv (VH-linker-V κ rész) DNS szakaszokat az első vectorból megfelelő restriktációs enzimekkel kivágva újabb, további tesztelésre és tisztításra alkalmas vectorokba építettem be. Először a pCANTAB (RPAS expressziós rendszer, Amersham Biosciences) vectorba lettek a kiválasztott klónok scFv szakaszai beépítve. TG1 és HB2151 E.coli baktériumokat transzformálva, IPTG indukcióval megfelelő mennyiségű és minőségű solubilis ellenanyag fragmens preparátumokat sikerült előállítanom. A kapott preparátumok további tesztelésre és tisztítási eljárásra megfelelőnek bizonyultak. Monoklonális anti E-tag antitest (Amersham) "hid" ellenanyag segítségével Fluoreszcens technikákkal és ELISA-val teszteltem vissza az ellenanyag minta specifikus kötőképességét különböző emlő és melanoma tumor sejtvonalakon (MDA MB231, IDC TU No1, TU No2, MCF7, SK-Mel 28, Mel 24, HT199, HT168-M1). Immunfluoreszcens FACS analízist (**1.ábra, 2.ábra**) és konfokális mikroszkópiát) alkalmaztunk szövetkamra ('chamber slide') és citocentrifugás kenet rendszerekben (**3. ábra, 4. ábra**). A fagyasztva maratásos (kriosztat) szövettani metszetek immunfluoreszcens konfokális mikroszkópos (**5. ábra, 6. ábra**). A glycolipid szerkezetű target antigén nativ szerkezetéhez relative közeli állapotának megőrzése a fagyasztott metszeten nehéz, de sikerült egy alkalmas fixálási technika kidolgozása.



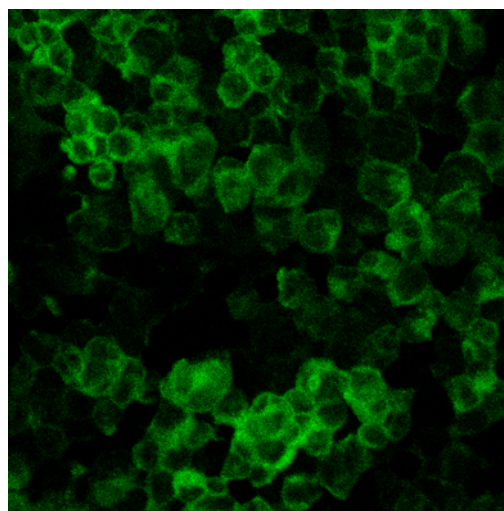
1. ábra: Invazív ductális emlőcarcinoma Tu No1 / α GD3 G2 scFv / IF – FACS analízis



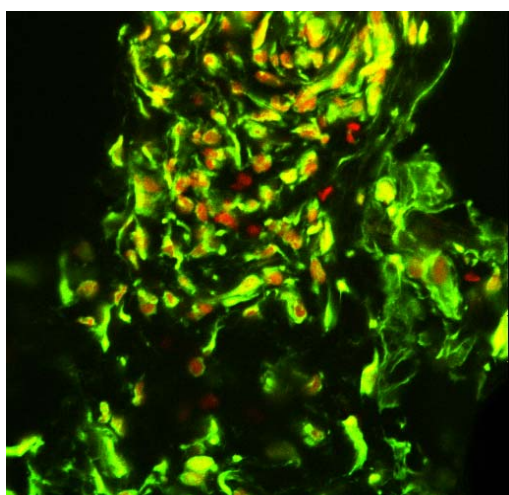
2. ábra: Invazív ductális emlőcarcinoma Tu No2/ α GD3 B2 scFv / IF- FACS analízis



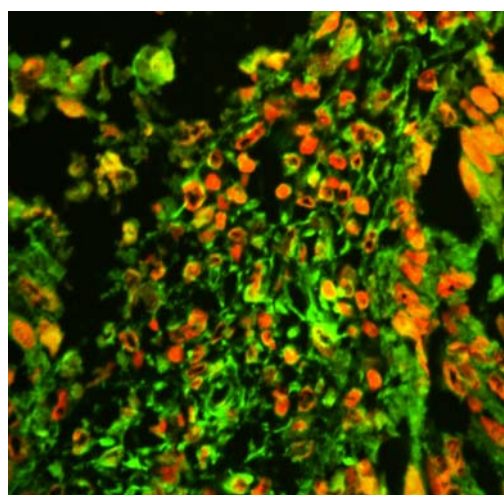
3. ábra: „Chamber slide” /SK Mel 28/ G2 scFv α GD3 IF / konfokális mikroszkóp



4. ábra: Citospin: Invazív ductális emlőcarcinoma TU2 / G2 scFv α GD3 / IF

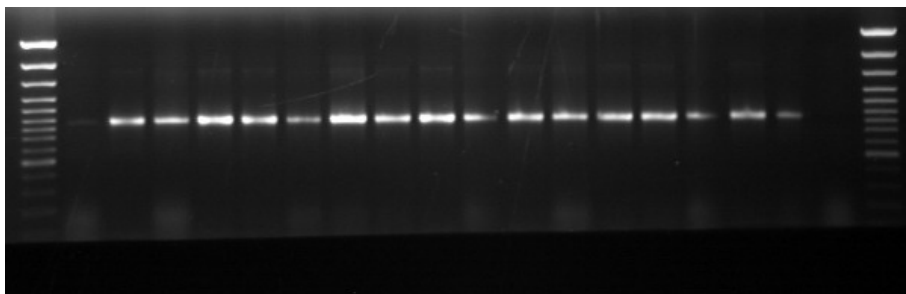


5. ábra: Melanoma M3407 kriosztatos metszet, G2 scFv α GD3 IF/ Konfokális mikroszkóp



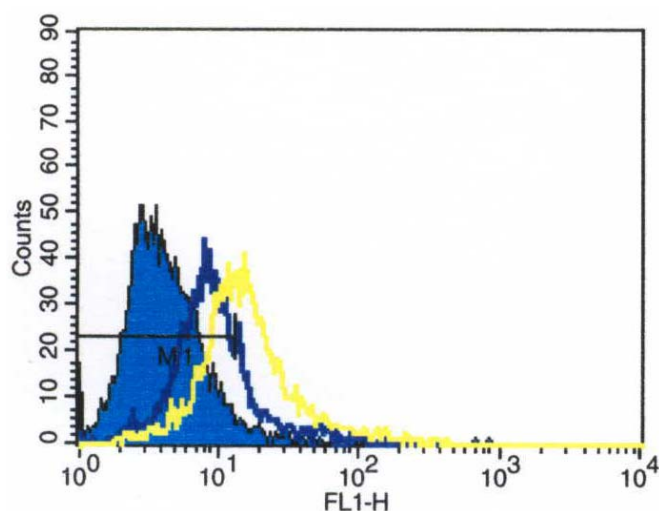
6. ábra: CRC57 colorectális carcinoma kriosztatos metszet/ G2 scFv α GD3 IF

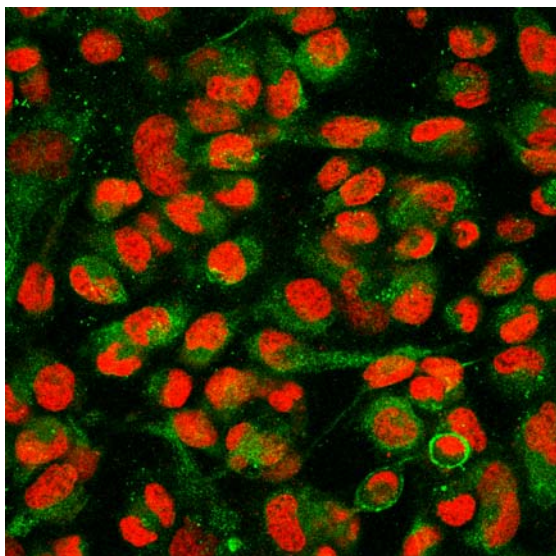
Sokféle releváns tumorsejtvonalból készítettem, a natív antigen strukturát legnagyobb mértékben megőrző sejt membrán preparátumot az ELISA tesztelési rendszerünkhöz. A kiindulási pozitív klónok, a tumorsejtkötő scFv fragmensek génrégióját újabb expressziós rendszerbe is átépítettem, a pET26b vectorba, majd BL21, NovaBlue, BL21 (DE3), BL21 (DE3)pLysS baktériumokat (Novagen) transzformáltam. A transzformált klónok „PCR screen” tesztelése analitikai gélelektroforézissel visszaellenőrizve mutatta a megfelelő méretű scFv insert pozitivitást (**7. ábra**). A pozitív bakteriális klónokból Qiagen plasmid minikittel preparált mintákból DNS szekvencia analízissel ellenőriztem vissza az eredeti IgVH és IgVκ nukleotidsorrendeket. SDS page és Western blot technikákkal történt a felszaporított pozitív ellenanyag termelő klónok termékeinek azonosítása. Az antiHis antitest segítségével az ellenanyag preparátumok tesztelhetők (**8. ábra**, **9. ábra**, **10. ábra**) valamint a HisTag fehérjetisztítási eljáráshoz megfelelő minta elkészült. A szolubilis scFv immunglobulin fragmens tisztítására a Bug Buster Ni-NTA His bind (Novagen), HisTrap Kit (Amersham) fehérjetisztítási módszereket alkalmaztam. A kötődés teszteléshez elég mennyiségű preparátumot sikerült nyernem. A biotinnal, fluoreszcens festékekkel és ¹²⁵J izotóppal való jelöléshez a módszer beállítási kontroll vizsgálatok indifferens mintán megtörténtek.



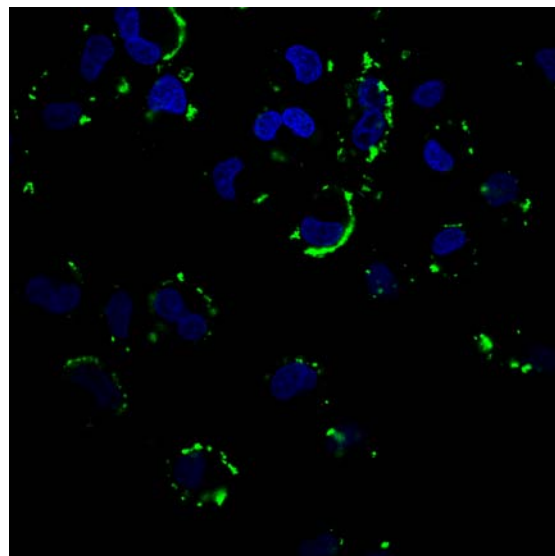
7. ábra PCR screen /
B2 scFv pozitív
klónok/ pET26b/
BL21 DE 3 Lys/
analitikai gél-
elektroforezis

8. ábra: IDC emlőcarcinoma (ZR751) sejtek/
új transzf. αGD3 gangliozid scFv preparatum-
mal kapott reakció/ IF FACS analízis





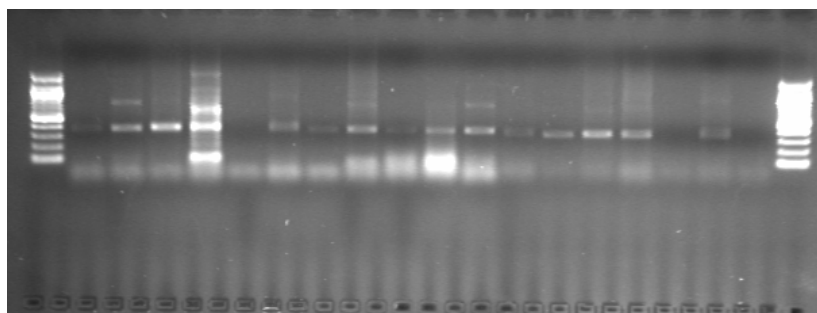
9. ábra: Melanoma M24 sejt fixáltan / G2 scFv B2 új preparatum/ IF /Konfokális/ FITC / PJ



10. ábra: Melanoma SK Mel 28 natívan / scFv preparatum/ IF/Konfokális/FITC/DAPI gangliozid tartalmú lipidaftok jelölődése

2. A tématervezés másik fő ága, tumorimmunológiai szempontból fontos kérdés tisztázásához

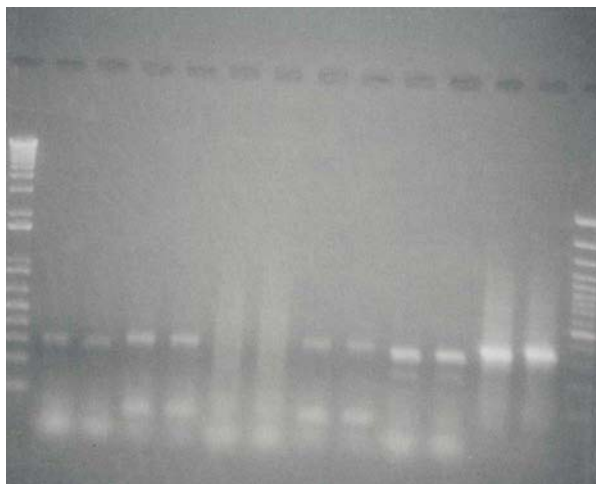
vezet: A tumort infiltráló B sejtek ellenanyagrepertoárja milyen sajátosságokkal bír egyéb emlőtumortípusok és más tumorok esetében? Invazív ductalis emlőcarcinoma (IDC) és medullaris emlőcarcinoma (MEC) mintákról sikerült megfelelő mennyiségben és minőségben immunoglobulin nehéz és könnyűlánc variábilis génszakaszokat RT-PCR technikával felszorzósítani (**11. ábra**). Emellett különböző melanoma szövetekből is sikerült immunoglobulin nehéz és könnyűláncrészeket nyernem, a klónozási munkához és ScFvK fág könyvtárak létrehozásához. Többféle klónozási technikát kipróbáltam. A nehéz és könnyűlánc génszakaszokból, az általam korábban kidolgozott „három lépéses PCR technikával” egyláncu ellenanyagfragmenseket lehetett létrehozni. Megfelelő vectorokba beépítve az új scFvK DNS szakaszokat, a korábban beállított módszerem és az RPAS technikával (Amersham Biosciences) megkezdődhetett az új fágkönyvtárak többszintű elemzése. Az egyedi klónok DNS szekvencia analízise és a specificitás tesztelés folyamatban vannak.



11.ábra: IDC és MEC eredetűTIL IgVH régiók /PCRI (360 bp) analitikai agaróz gélelektroforézis

A fő kérdéskör első megközelítéseként *emlő és melanoma tumorokat infiltráló B sejtek genetikai jellemzését kezdtük meg* az expresszált immunglobulin (Ig) nehéz és könnyű lánc variábilis gén régiók amplifikálásával megfelelő primerekkel és a polymerase láncreakciós technika korábbiakban beállított speciális protokolljának (PCR I) megfelelően (Ref. 3).

12. ábra Melanoma TIL Ig V κ (340bp) és VH (360bp) variábilis gén régiók / PCR I termékek preparatív agaroz gelelektroforezis.



Az analitikai gélelektroforézis során megfelelő mennyiségű és minőségű immunglobulin nehéz és könnyűlánc PCR I termékeket, preparatív, alacsony olvadáspontú agaroz gelelektroforézissel feldolgozva, a megfelelő bázispár (bp) hosszúságú mintákat (**12. ábra**). Qiaquick oszlopos módszerrel (Qiaquick gel extraction kit, QIAGEN GmbH, Germany) tisztítottuk. A kapott VH és V κ PCR I preparátumokat quantitative (spektrofotometriás optikai denzitás mérés) és qualitative (analitikai agaroz gelelektroforézis) ellenőriztük.

DNS minták bakteriális klónozása: A kiválasztott különböző eredetű tisztított Ig nehéz (VH, n=6) és könnyű lánc (V κ , n=6) preparátumok megfelelő enzimes kezelését követően pUC18/SmaI/BAP vectorba építettük be ún. „blunt end” (tompá vég) kapcsolással. Megfelelő előkezeléssel kémiai kompetenssé tett *E.Coli* TG1 baktériumokat transzformáltunk hő sokk módszerrel. A petricsészén levő megfelelő táptalajon való szélesztés után nyert nagy számú baktériumtelepből random választott klónok PCR „screen” módszerrel lettek tesztelve (Ref 3.). Az analitikai gélelektroforézissel viszonylag magas százalékban tudtunk insert pozitív klónokat meghatározni mindegyik transzformáció esetében.

Felnövesztve a szelektált insertet hordozó pozitív baktérium klónokat (Ig VH, n=75 és V κ , n=36) QiaPrep kittel plasmid preparátumokat készítettem, és a minták mennyiségét és minőségét optikai denzitás méréssel és analitikai gélelektroforézissel pontosan meghatároztam. Valamennyi klón minősége megfelelő volt a következő DNS szintű elemzésre.

DNS szekvencia meghatározás és összehasonlító analízis: Jelentős számú emlőtumor (Ig VH, n=85 és Ig V κ , n=60) és melanoma eredetű (Ig VH, n=60 és Ig V κ , n=30) DNS szakaszokat hordozó kettős szálú plasmid minta nukleotid sorrendjét sikerült meghatározni, jó minőségben és kielégítő hosszúságban. A Chromas, BioEdit, Clustal W és TreeView és legutóbb már a Vector NTI 11 programok valamint az IMGT és Blastn regisztrált DNS szekvencia adatbázisokkal együtt a korábban definiált speciális tulajdonságú halmozott előfordulást mutató szekvenciákkal való összehasonlító elemzést végeztem el.

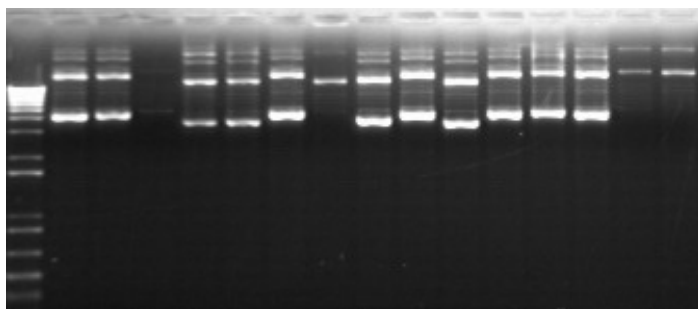
PCR II reakció és tisztított preparátumok majd ScFvK konstrukció:

Az eredeti kiválasztott emlő és melanoma eredetű Ig VH és V κ PCR I preparátumok alapján megfelelően tervezett primerekkel PCR II technikával állítottam elő egyláncú ellenanyag fragmensek létrehozásához megfelelő DNS mintákat. Alacsony olvadáspontú agaroz gélelektroforézist követő Qiaquick oszlopos módszerrel tisztított preparátumokat kaptam, melyek mennyiségét és minőségét a szükséges optikai denzitásméréssel és analitikai gélelektroforézissel teszteltem. Az emlőtumorok és melanoma TIL Ig VH és Ig V κ PCR II termékek megfelelő minősége az antitest fragmens létrehozás fontos feltétele. Az Ig VH és Ig V κ PCR II termékeket speciálisan tervezett polimeráz láncreakciós technikával (PCR III) kapcsoltam egyláncú ellenanyag fragmenssé, a korábbiakban általam beállított eljárásnak megfelelően (Ref. 4, 5). Alacsony olvadáspontú agaroz gélelektroforézis kapcsán kinyerve a megfelelő bázispár hosszúságú ellenanyagfragmenst meghatározó szakaszokat (n=3 melanoma mintából, n= 3 emlőtumorokból), azok további tisztítását, minőségi és mennyiségi ellenőrzését végeztem el. A **13. ábra** a melanoma TIL-B PCR III reakció termékeket, a kész antitest fragmenseket kódoló DNS láncok preparatív gélelektroforézisének képét mutatja.

Megfelelő phagemid vectorokba való bekapcsolás "ligálás": A kiválasztott phagemid vectorok a felnövesztett bakteriumszuszpenzióból QiaPrep oszlopos technikával (QIAGEN GmbH, Germany) lettek preparálva, megfelelő enzimes kezelésnek alávetve, majd preparatív gélelektroforézist követően tisztítva. *A sikeres vectorba kapcsolási és az azt követő bakteriális transzformációs lépések megalapozzák a szekvenciaanalízissel nyert elemzések kísérletes továbbvitelét (14. ábra).*

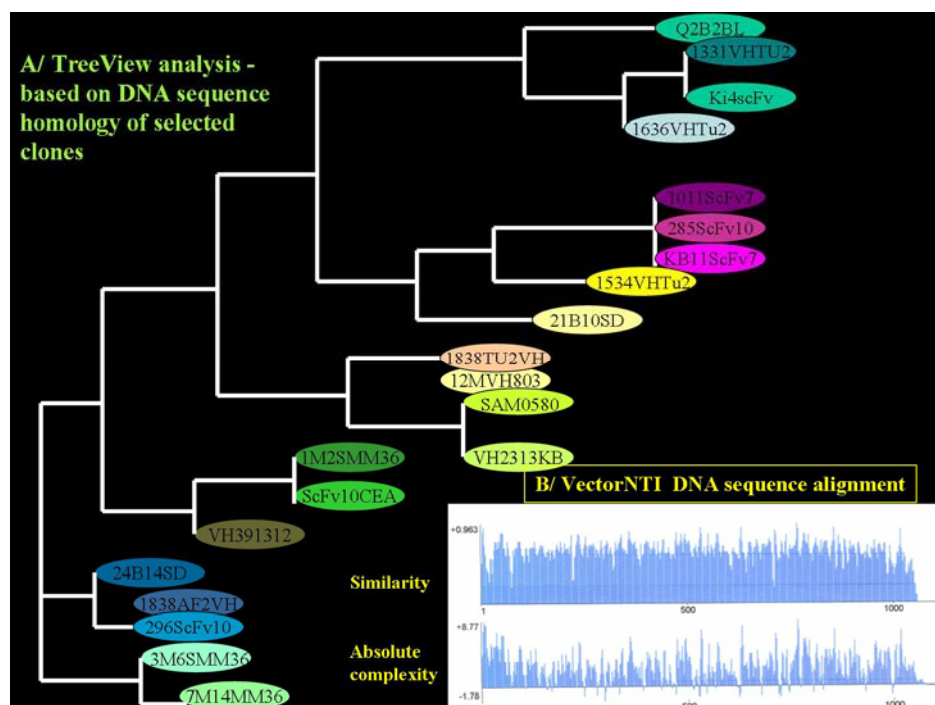


13. ábra ScFvK régiók kinyerése pozitív klónokból preparatív agaroz gélelektroforézis segítségével



14. ábra ScFvk pozitív klónok felszaporítását követő QIAprep plasmid mini preparátumok megfelelő tisztaságban és mennyiségben elemzésre és Tu ag kötődési tesztekhez

Az emlőtumor TIL B sejt immunglobulin repertoár vizsgálatok mellett, így a melanoma eredetű Ig nehéz és könnyűláncrégiók DNS szintű analizisét is megkezdhettem. A részletes adatgyűjtés és adatfeldolgozás rendkívül időigényes, az azt megelőző DNS szekvencia



15. ábra: Szelektált immunglobulin variábilis nehézlánc régiók DNS szekvenciáinak összehasonlító elemzése. Homológia szint alapján számítható legközelebbi kapcsoltság szintek ábrázolása „Tree View” alapján.

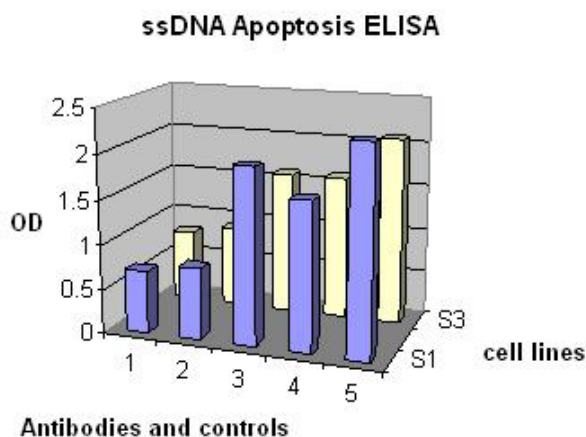
meghatározás nagyon pénzigényes folyamatok. A munkának ez a része feltétlen tovább folytatandó. Az emlőtumor és melanoma eredetű B sejtek ellenanyagrepertoárjának DNS szintű összehasonlító elemzése nemzetközileg is teljesen új információval szolgál. A csírvonal szekvenciáktól való eltérés mértéke, az átrendezett immunglobulin variábilis genregiókról kapott jellegzetes információk valamint az *általam korábban meghatározott kulcsszekvenciákhoz való nagyfokú homológia (15. ábra)* egyértelműen megalapozza a tumorasszociált molekulák specifikus felismerésének lehetőségét. A preparatív munka

eredményei lehetővé teszik a kérdéses antitest fragmensek fág megjelenítéses könyvtár formájában való közvetlen és hatékony tesztelését tumorkötő képesség szempontjából. Mivel ezt a speciális technikát sikerült továbbfejleszteni tumor progresszióban közvetlenül fontos sejtfelszíni struktúrák meghatározására, nagy esélyt látunk további „kulcs” specificitással bíró humán antitestek előállítására.

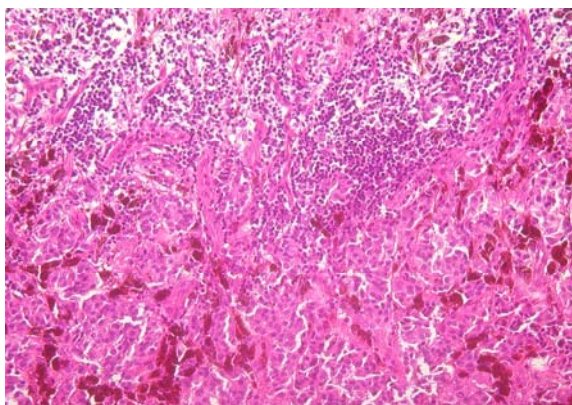
3. A diagnosztikus alkalmazhatóság előfeltételeként a fixált és beágyazott szövetek speciális glikoszfinbolipid struktúráinak immunhisztokémiai jelölhetőségét igazoltuk.

Az kiindulási tumorsejt specifikus scFv fragmens az új expressziós rendszerekben (pCANTAB/ HB2151 E. coli TG1 bakterium (Amersham), pET26b vektor / BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3)pLysS baktériumok, Novagen), IPTG indukcióval kinyerhető volt szolubilis formában a baktérium sejtek felülúszójából, a periplazmából és a bakteriális sejtlizátumból. A kötődési teszthez szükséges különböző emlőtumor, melanoma és kolorektális karcinoma (kriosztátos és paraffinos) szövetmetszeteket készítettünk. A sejt kultúra lemez alapú rendszerben valamint kriosztátos szövetmetszeten a dúsított ellenanyagpreparátumok már korábbiakban is jó jelölést mutattak, így pozitív kontrollként is használhattuk. Az immunfluoreszcens konfokális vizsgálatok révén megerősödött a korábban feltételezett, *különleges tumor asszociált struktúrákhoz való kötődésképesség emlőrák és melanóma vonatkozásában*. Igazolható volt, hogy az ellenanyag fragmens által definiált *célantigének nagyon fontosak a tumorprogressziós folyamatban* és többek között a programozott sejthalál (*apoptózis*) szempontjából is *lényegesek*. Ez utóbbival kapcsolatban saját vizsgálatok is vannak már (**16. ábra**). A TIL-B (**17.a,b ábra**) termelte immunglobulinok tumorfelismerő kapacitásának molekuláris szintű elemzése melanomákban különösen érdekesnek bizonyult, mivel a *GD3 gangliozidok a malignus melanomákon legerőteljesebben kifejezettek*. A humán tumorsejtek nagy mennyiségű abnormális szénhidrát struktúrát halmoznak fel a normális szövetekhez képest. *Ez az aberrans glikolizáció egyik fontos jellemzője ráksejteknek, és a rákképződés és terjedés folyamatában lényegi*. A jellegzetes sajátosságú szénhidrát struktúrák fontos részei a ceramid vázas szialilált glikoszfinbolipideknek, gangliozidoknak. A kialakuló jellegzetes, igen sokféle glikozil epitóp glikoprotein és glikolipid természetű tumorasszociált antigének része, és még további változatosság lehetséges az acetil és egyéb biokémiai származékok révén. Az immunhisztokémiai módszertani lehetőségek megfelelő beállításával és standardizálásával, az érzékeny glikoszfinbolipid struktúrákat a kvantitatív különbségeket is kimutatható formában sikerült jelölnünk, ami a daganatos és diszplazias szövetelemzés kérdésében döntő. *Az új tumor reaktív antiGD3*

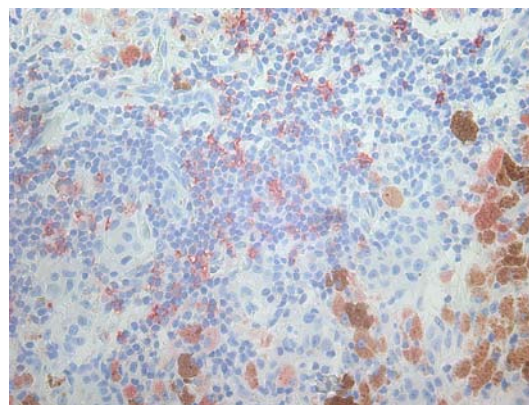
gangliozid specifikus ellenanyag fragmensünk a tumorprogresszió és invázió szempontjából fontos struktúrákat jól jelölte immundiagnosztikus célra használható paraffinos metszeteken és tűbiopsziás keneteken is.



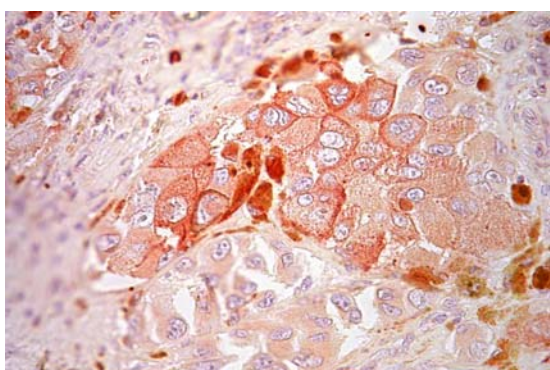
16. ábra: aGD3 antitestek (3: HCBC3, 4: B2 scFv antitest, 5: a GD3 MoAb) által indukált apoptózis S1: invazív ductális emlőcarcinoma és S2: SK-Mel 28 melanoma sejtvonalak esetében



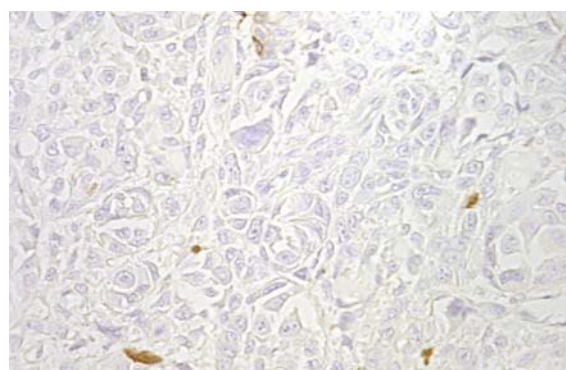
17.a.ábra: Melanoma szövetminták paraffinos metszeteinek (Haematoxiniln & Eosin) festése



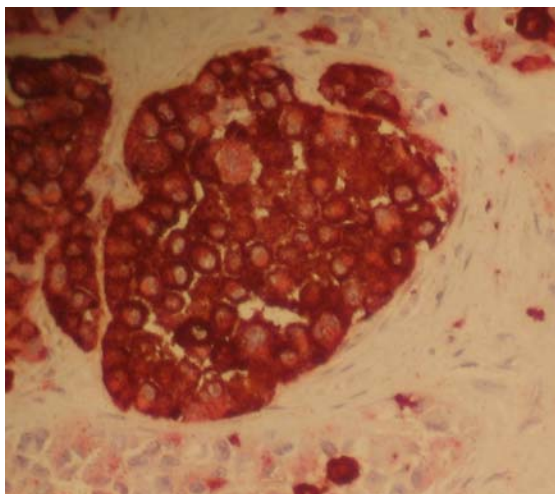
17.b.ábra: Melanoma szövetminták paraffinos metszeteinek immunhisztokémiai reakciója (a TIL-B sejtek CD20pozitivitása)



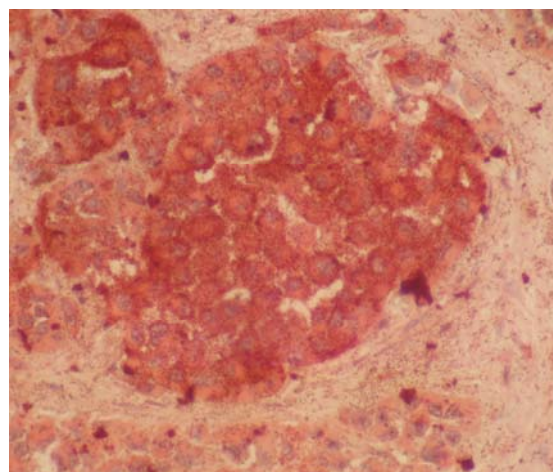
18.a ábra: Melanoma szövetminta / paraffinos metszet /immunhisztokémia α GD3 gangliozid antitesttel jelölve (200x)



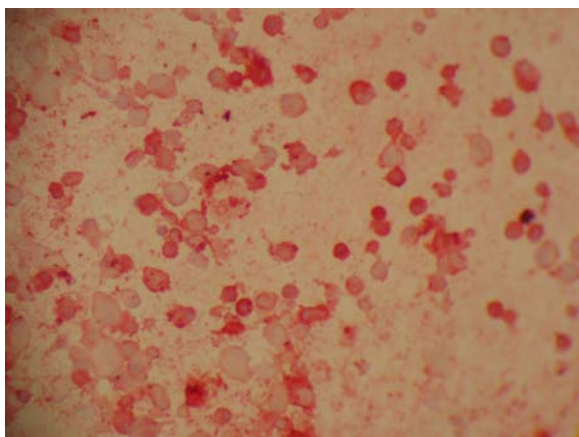
18.b ábra: Melanoma szövetminta paraffinos metszet / immunhisztokémia negatív kontroll



19. ábra Melanoma form fixált/ paraffin HMB45 pozitív sejtek / Immunhisztokémia



20. ábra Melanoma form fixált/ paraffin α GD3 pozitív sejtek/ Immunhisztokémia200x



21. ábra Melanomas beteg tübiopsziás nyirokcsomó mintája / α GD3 pozitív sejtek/ immuncytokémia / AP / Fuchsin (200x)

4/ Eredmények bemutatása kongresszusokon a tématervi együttműködés építésére

Az elmúlt évek alatt igyekeztem a témához közel álló rákkutatási vagy humán immunoglobulinok vizsgálatára vonatkozó nemzetközi ill. általános hazai kongresszusokon résztvenni. Az Amerikai Rákkutatási Társaság (*AACR*) 96th kongresszusán (Washington, 2006) bemutatott posterem érdeklődést váltott ki, és egy nemzetközi kollaborációs tanulmányúti lehetőséget eredményezett (John Wayne Rákkutatási Intézet, JWCI). Az együttműködő partner a gangliozid irányú kutatás miatt is igen fontos. A *Human Antibodies and Hybridomas* kongresszuson (2006, május 5 -7) előadás tartására kaptam lehetőséget, az anyag cikk formában közlésre került. Az *Immunotherapy 2006, Targeting Complexity* nemzetközi Workshopra (Havanna, 2006) benyújtott absztraktomat, előadásra jelölték és közölték. Résztvettem az Európai Rákkutatási Társaság (*EACR*) Kongresszusán és az *Immunogenomics es Immunomics Kongresszuson* 2006 októberében Budapesten. Az utóbbin szereplő

poszteremet az *AACR Frontiers of Cancer Prevention Research* nemzetközi rendezvényén (Boston, November 2006) is bemutattam. Az amerikai kongresszusi részvétel kapcsán a kollaboráló intézményekben (RMRF, JWCI) is tölthettem egy kis időt, ami a klónozási munka szempontjából igen hasznos volt. Az *Antibody Engineering* fontos szakmai konferencián (San Diego, December 2006) bemutatott munkám után érdeklődő korábbi együttműködőkkel egyeztettem az új eredményeket. Az AACR “*Chemistry in Cancer Research*” (2007. Február) rákterápiás gyógyszerek hatásmechanizmusát összegezte. A kongresszussal egybekötött szakmai együttműködési tanulmányút a részletes szekvencia analízis munkát segítette. A Centennális Nemzetközi AACR Kongresszuson (2007. Április, Los Angeles) a beküldött összefoglalóm az AACR Avon Scholar in Training abstract és poszter díjat nyerte. A poszter kapcsán egy beszámoló előadásra kaptam meghívást Prof Dr Francesco Marincola-tól a NIH/CC Bethesda/ Washington DC-be, aminek 2008 február végén eleget is tettem a “NERD series” rendezvénysorozat keretében. A X. Nemzetközi ISIR kongresszuson előadással és poszterrel szerepeltem (2007. Junius Opatia), ahol a Yale Egyetem egy profeszora ajánlott együttműködést, hogy az általam kidolgozott technika ovarium carcinomára és choriocarcinomára is kipróbálásra kerüljön. A John Wayne Rákkutatási Intézetben (Santa Monica) szervezett Immunterápiás Workshop-t követően, a fenti AACR poszter módszertani és kísérleti munkájának előadás formájában való bemutatására kaptam lehetőséget. A 2007 / 2008 év során lebonyolított intézetváltás, labormegszűnés és később új lehetőség kiépítése a kísérleti munkát nehezítette. Azonban a DNS elemzések computeres munkáit átcsoportosítottam erre az időszakra. A munka egyrészt a hozzáférhető adatbázisok EMBL, GenBank, DDBJ, BLASTn, IMGT és különböző nukleinsav elemző softwerek (BioEdit, TreeView, Vector NTI) felhasználásával végzett összehasonlító DNS szekvencia analízisből állt. Ehhez ismert antigénspecificitással rendelkező antigén kötésért felelős Ig variábilis génrégiók jellegzetes tulajdonságait elemeztem a nemzetközi ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://imgt.cines.fr>) magas minőségű integrált információs rendszerrel, amely kimondottan a humán (és más gerinces) immunglobulin, T sejtreceptor és fő hisztokompatibilitási antigénkomplex molekulákra specializálódott. A standardizált nukleotid és protein szekvenciákat, oligonukleotid primereket, géntérképeket, genetikai polimorfizmusokat, 2D és 3D szerkezeteket alapul véve volt lehetőség a kiterjedt összehasonlító analízisre amely révén a kérdéses Ig variábilis nehéz és könnyűlánc tulajdonságok feltérképezhetőek. Az IMGT/V-QUEST, IMGT/JunctionAnalysis, IMGT/Allele-Align, IMGT/PhyloGene interaktív-t használtam. A 2008. és a 2009. év igen aktívnak bizonyult több szempontból. Az új kutatóhely kínálta más feltételek és lehetőségek hozzájárultak a tématerv új irányú alakulásához, a jó közösség

segítette a munkavégzést. A „6th International Congress on Autoimmunity” (2008.szeptember Porto), a „8th International Conference of Anticancer Research” (2008. október Kos), valamint a „14th International Congress on Human Antibodies and Hybridomas” (2008. november, New York) kongresszusokon hosszabb előadások megtartására kaptam felkérést a beküldött absztraktokkal.

Az elmúlt év legfontosabb eseményei közé tartoztak a 100. AACR rákkutatási kongresszuson (2009. április) való részvételt követően a CITIM (“First International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring”, 2009 május, Kiev), ahol absztrakt és előadás díjat kaptam. Felvettek az iSBTC (International Society for Biological Therapy of Cancer) társaságba, ami kitűnő lehetőség a tumorimmunológia legaktuálisabb kérdéseiről neves kutatókkal és klinikusokkal beszélni. Ennek keretében vettem részt az “iSBTC- FDA-NCI Workshop-on (Prognostic and Predictive Immunologic Biomarkers in Cancer) és az éves kongresszuson (2009. október Washington DC). A kísérletes munkám bemutatása, a közösen írt legutóbbi két cikk és a többszintű megbeszélések felkeltették az érdeklődést, hogy a NIH/NCI Bethesda egyik neves tumorimmunológusa, Prof. Dr Francesco M Marincola (Assoc. Director Trans-NIH Center for Human Immunology, Director CC/CHI FOCIS Center of Excellence, NIH) elfogadva a meghívást, ellátogasson a laboratóriumunkba, további együttműködési lehetőségek háttérének kiépítése és előadások tartása (OOI/ Budapest és DOE/ Debrecen) végett. A tervezett 2009 novemberi időponthoz képest 2 hónappal később, de igen sikeresen megvalósult a látogatás. Ennek eredményeképpen újabb közös Review közleményen dolgozunk, és beadásra került egy melanoma témájú pályázat a részemről, amely elnyerése a TIL-B sejtekkel kapcsolatos mélyebb, funkcionális szerepet feltáró aktív kollaborációs munka anyagi háttérét fedezné.

5/ Összegzés, awardok és lehetőségek

A tumorimmunológiai munkánk *transzlációs kutatási jellegű*, hiszen a tumor diagnosztika számára egy kulcsfontosságú tumorasszociált antigénnel specifikusan reagáló antitest immunkonjugatum daganatos és normál szöveti differenciál diagnosztikus lehetőségeit elemzi. Az egészséges szövetek szélesebb körű vizsgálata még fontos lesz, hogy az eddigi eredmények (a legtöbb normál szövettípus jellegzetes negativitása illetve alacsony szintje) további bizonyítást nyerjenek. Azonban *az egyértelműen megállapítható, hogy a malignus folyamat eredményét ezen egyedi GD3 gangliozid struktúra erősen jelöli a különféle daganatos szövetminták esetében.* Az antitest preparálási munka és az elvégzett módszertani beállítás alkalmassá teszi a diagnosztikában fontos fixált, paraffinba ágyazott és tübiopsziás úton nyert

mintákban ezen összetett biokémiájú szialilált glikoszfinbolipid molekulák diagnosztikus panellben való kiegészítő felhasználását.

Ez a molekuláris genetikai és biotechnológiai módszerrepertoárt átfogó kutatási munka, a szolid tumorokban fellelhető immunkompetens sejtek elemzésével és az ellenanyagtervezés új módszerével nemzetközileg is elsőként igazolja a specifikus tumorsejtfelismerő antitestek felhalmozódását, kinyerési és további felhasználáshoz vezető útjának lehetőségét.

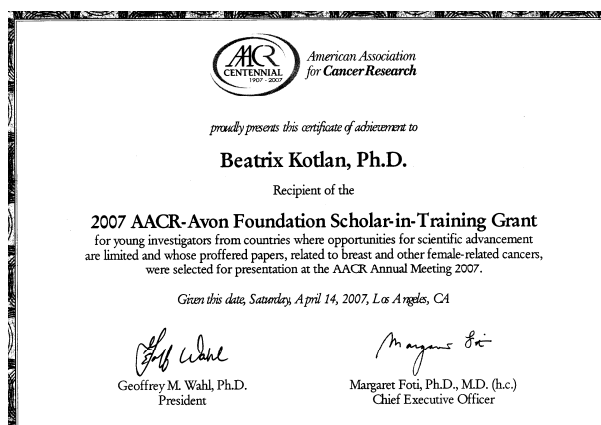
A malignus folyamatok kialakulásáról, a tumorszövet jellegzetességeiről és tumor asszociált molekulákról kapott új információk diagnosztikus vagy terápiás célból jelentőséggel bírnak.

A kiterjedt összehasonlító immunglobulin DNS szekvenciaanalízis még további új adatokat tárt fel különböző emlőrákok és melanoma vonatkozásában, amelynek kísérletes igazolása folyamatban van. Az erre vonatkozó eddigi érdekes eredményeket még nem közöltük le, két indokból: A háttérrel adó eredeti technika megkezdett újdonság bejelentése és a diagnosztikus alkalmazhatóság kidolgozásával kapcsolatos időigényes munkavégzés miatt.

Azonban a tumorimmunológiai érdekesség és az „új biomarker“ tumordiagnosztikus lehetőség miatt feltehetően sikerül az összeállított három új cikk anyagát színvonalas újságokban közzélnünk hamarosan, az OTKA hivatkozási szám feltüntetésével.

Fontosnak tartom megjegyezni, a munka részeredményei kapcsán kapott nemzetközi awardokat, mivel ezek is hozzájárultak a munka háttéréhez:

- 1/ AACR Avon Foundation Scholar in Training Award (Baltimore, 2005)
- 2/ AACR Centennial Avon Foundation Scholar in Training Award (Los Angeles, 2007)
- 3/ NERD Novel Experimental Research Development Award, (NIH/CC/CHI Washington DC, 2008)
- 4/ CITIM Cancer Immunotherapy & Immunomonitoring Outstanding Abstract and special oral Presentation Award (Kiev, 2009)



22. ábra: Az AACR Centennial 2007 kongresszuson kapott Avon Foundation Award igen emlékezetes számomra és több lehetőséget megalapozott.

A szolid tumorok progressiójában és a rákos sejtek inváziójában szerepet játszó kulcsmolekulák felkutatása igen ígéretes, hiszen *ezen target struktúrákkal reagálni képes molekulák potenciális terápiás jelentőségűek*. A problémakörhöz remélhetően alapjaiban hozzájárulnak nemzetközileg és hazailag is úttörő kutatásaink és azok továbbfejlesztése az új együttműködések és továbbiakban elnyerhető témapályázati munkáink révén.

Ezúttal szeretném megköszönni az OTKA támogatását a tématerv megvalósításához:

Dr Kotlán Beatrix
 biológus kutató
 OTKA T048933 témavezető

6. Hivatkozások:

- 1/ **Kotlan B**, Simsa P, Foldi J, Fridman W H, Glassy M, McKnight M, Teillaud JL. Immunoglobuline repertoire of B lymphocytes infiltrating human breast medullary carcinoma. (2003) *Human Antibodies* 12: 113 – 121. 2003
- 2/ **Kotlan B**, Simsa P, Teillaud JL, Fridman WH, Toth J, McKnight M, Glassy M (2005). Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas. The proof of principle concerning the infiltrating B lymphocytes. *J. Immunology*, **175**: 2278 – 2285
- 3/ **Kotlan,B**, Gruel N., Zafrani B, Furedi G, Földi J., Petranyi G., Fridman W.H., Teillaud J.L. (1999). Immunoglobulin variable regions usage by B-lymphocytes infiltrating a human breast medullary carcinoma. *Immunology Letters*, **65**: 143
- 4/ **Kotlan B.**, Simsa P., Gruel N., Földi J., Fridman W.H., Petranyi G., Teillaud J.L. (2001). A scFv phage display mini library generated from the immunoglobulin repertoire of breast medullary carcinoma infiltrating B lymphocytes. *Disease Markers*: **16**: 25
- 5/ **Kotlan B** and Glassy MC: (2009) Antibody phage display – a powerful technology that has quickly opened windows into the clinic. In: Antibody Phage Display 2nd ed * ISBN: 9781603273015 Ed: Aitken R. The Humana Press, Inc, Totowa, New Jersey USA, Series *Methods Mol Biol.* 562:1-15.

Budapest 2010 március 21.