



Kotlan Beatrix

„A rosszból is a jót kihozni!”

A tumorban rejlő immunsejtek
hordozta genetikai információ a
rákterápiában hasznosítható.

Budapest, 2011. Május 10.

www.meetthescientist.hu



„A rosszból is a jót kihozni!” A tumorban rejlő immunsejtek hordozta genetikai információ a rákterápiában hasznosítható.

„A rosszból is a jót kihozni.”

Ez a mottó kísér évek óta, hogy az egészségügy nehéz keretei között a betegellátáshoz közvetlen közel dolgozzam biológus kutatóként.



**És a másik most is fülembe csengő mondat:
„Jöjjön, nézze meg a betegeinket!”**

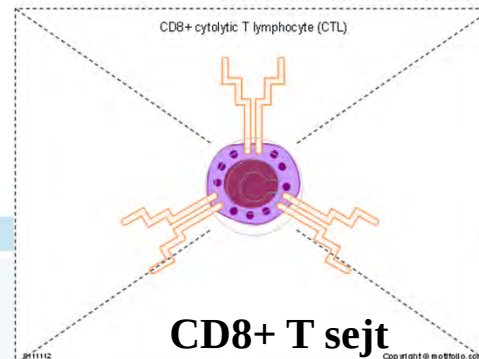
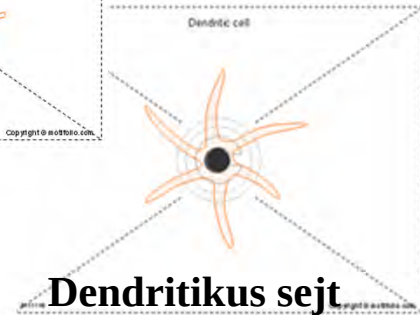
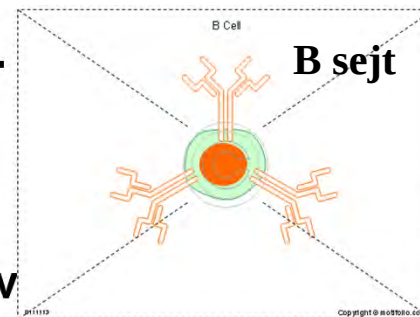
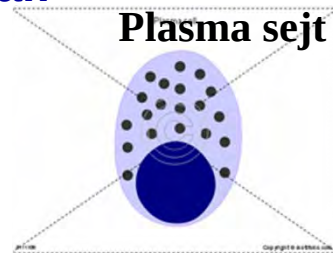
Az „ezerarcú immunológia” néhány oldaláról és főbb alapfogalmairól kell először rövid képet adnom.

A veleszületett / természetes immunitás főbb vonásai:

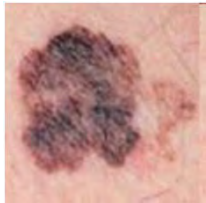
A törzsfejlődés ősibb un veleszületett immunitása (komplement, macrophagok, Natural Killer sejtek, hízósejtek, citokinek, citokin receptorok stb) gyorsabban alakul ki, nem antigén specifikus, nem rendelkezik memóriával.

A szerzett / adaptív immunválasz főbb elemei és tulajdonságai:

- Antitestek, limfociták, dendritikus sejtek,
- Az antigén specificitás sejt és molekulaszinten jellemző az antitestekre, T sejt receptorokra, és az ezeket hordozó B és T sejtekre,
- Az immunválasz erősítése exponenciális.
- Immun memoria jelensége van.
- Az antigénnel való kölcsönhatás szelektív
- Latencia van.



A rákos megbetegedések tumorimmunológiai vonatkozásai és az immunrendszer rákos megbetegedéssel szembeni potenciális reakciója.



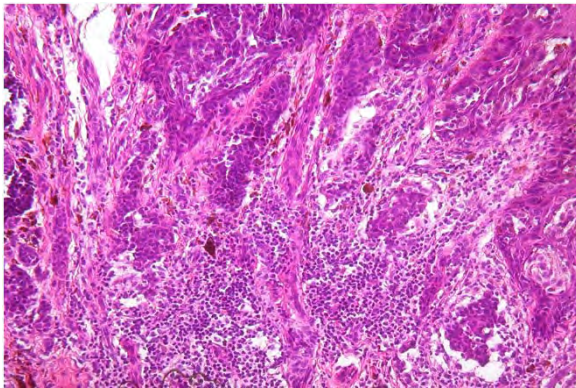
A tumor ellenes sejtes és humorális immunválasz fontos elemei a szolid tumorokban felhalmozódó immunkompetens sejtek. Az tumorba beszűrődő, **tumorszövetet infiltráló immunsejtek (TIL, tumor infiltrating lymphocytes)** legnagyobb része T sejt, makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölő (NK) sejtek és általában minor mennyiségben humorális immunválasz elemek. A TIL sejtek *tumor és gazdaszervezet kapcsolatát jobban tükrözik*, mint a perifériás vér és nyirokszervek sejtes komponensei. **Ezen effektor sejtek funkciója azonban csökkentett** a perifériás vér értékeihez képest. A **tumor mikrokörnyezete alapvetően befolyásolja** a gazdaszervezet és a tumor közti kapcsolatot.

Az igen ritka az ún. „tumorkilökődési folyamat” jelensége.

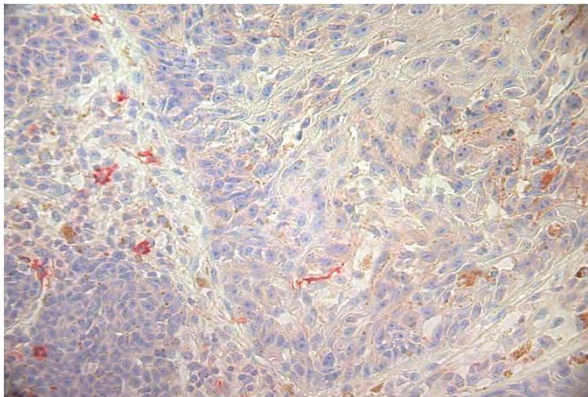
Nagyon összetett immunológiai mechanizmusok időnként a „tumor kilökődését” eredményezhetik, ami sok átfedést mutat az egyéb, immun rendszer által közvetített szövet specifikus leépítési folyamatokhoz (TSD, „tissue specific destruction”), mint pl: allograft kilökődés, graft versus host jelenség, patogének eliminálása és az autoimmunitás.

Hogyan lehet megtalálni és kimutatni az immunrendszer akár minor mennyiségben rejtőzködő speciális immunsejtjeit a daganatokban?

Nodular melanoma

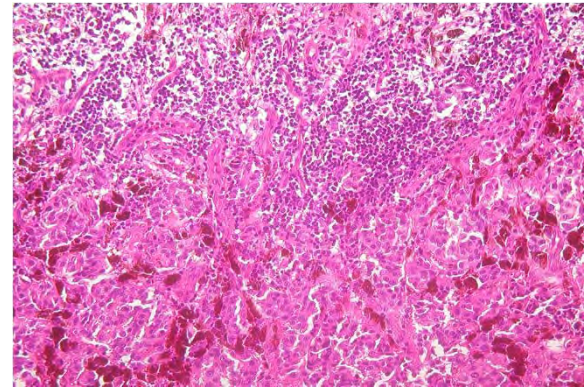


IH: Haematoxilin & Eosine

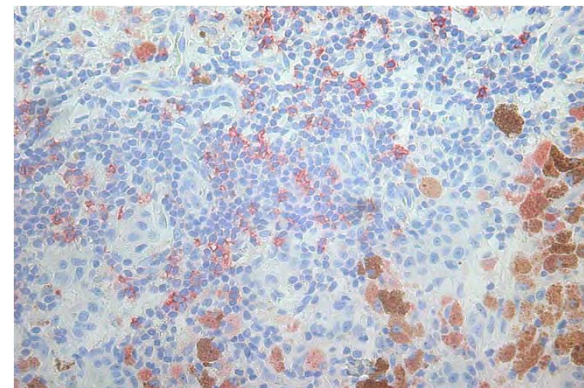


IC: CD20 + B cells 200X

Superficially spread melanoma



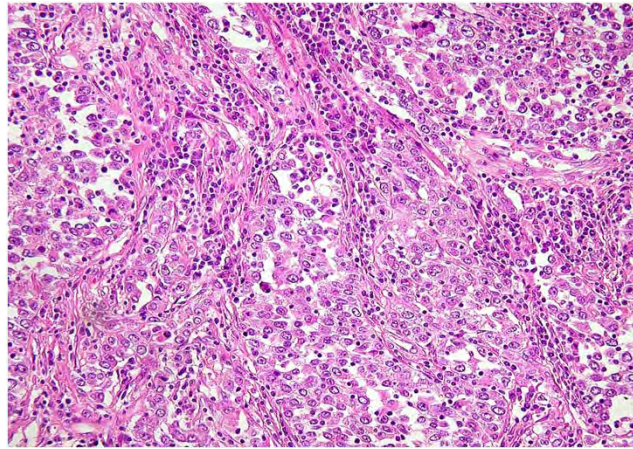
IH: Haematoxilin & Eosine



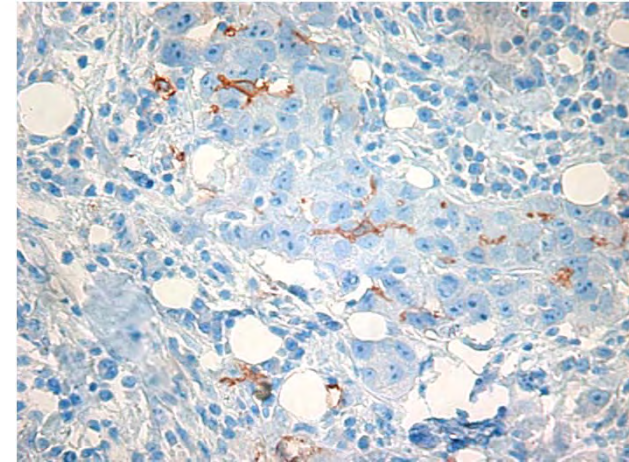
IC: CD20 + B cells 200X

Tumor infiltráló sejtek / TIL: Tumor infiltrating lymphocytes

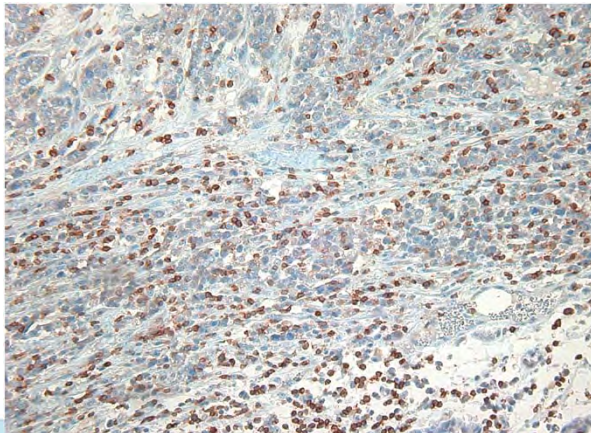
Medullary breast carcinoma



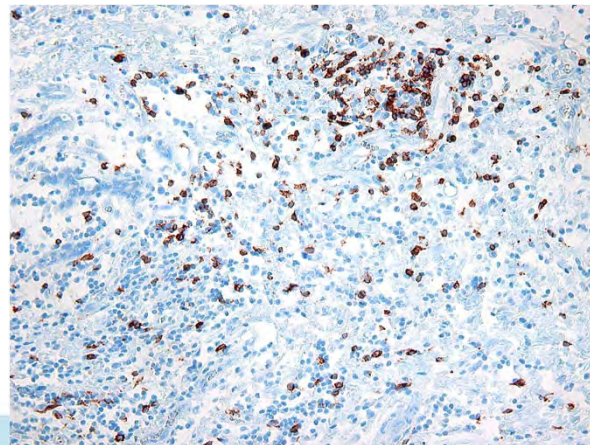
(Haematoxylin & Eosine) 100X



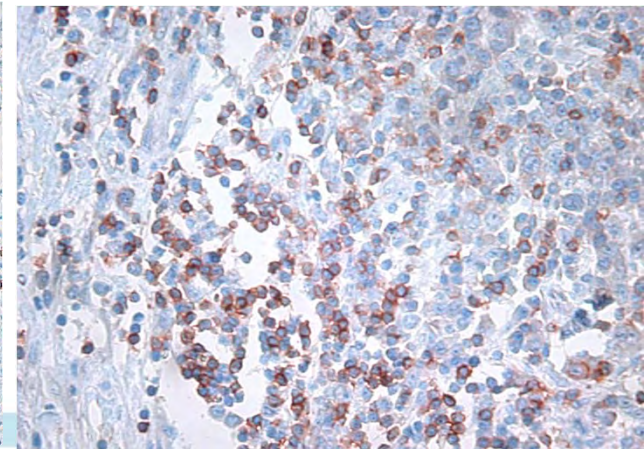
IC: CD1a + DC 100X



IC: CD3 + T cells 100X
www.meetthescientist.hu



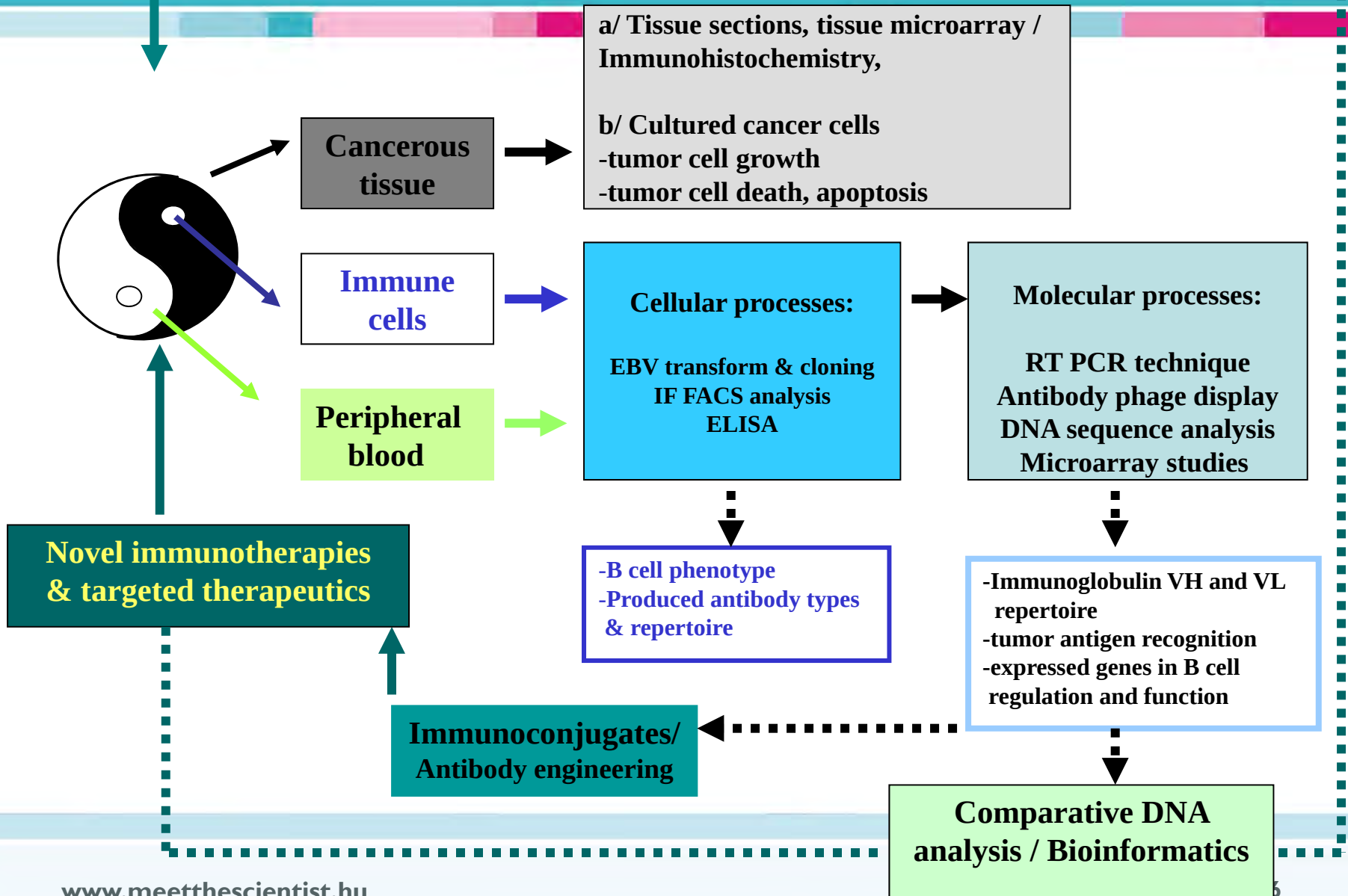
IC: CD20 + B cells 100X



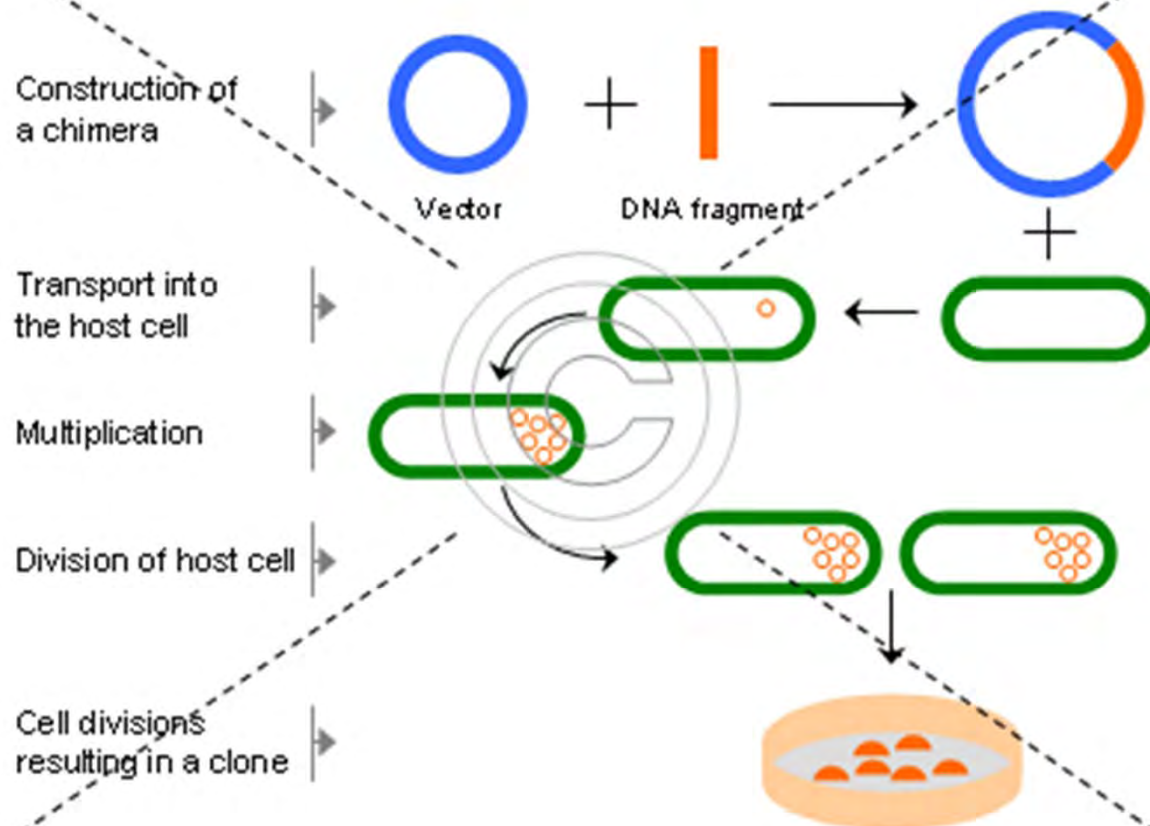
IC: CD5 + cells 200X
8 | 26

Szeretnék képet adni azon **sejtes immunológiai, molekuláris genetikai és biotechnológiai** módszerrepertoárról, amely az „immunsejtek vallatására alkalmazható” lehetőséget adja, és amelyek révén feltárt genetikai információ az eredmények alapján hasznosítható.

Novel tumor diagnostics



Molecular cloning



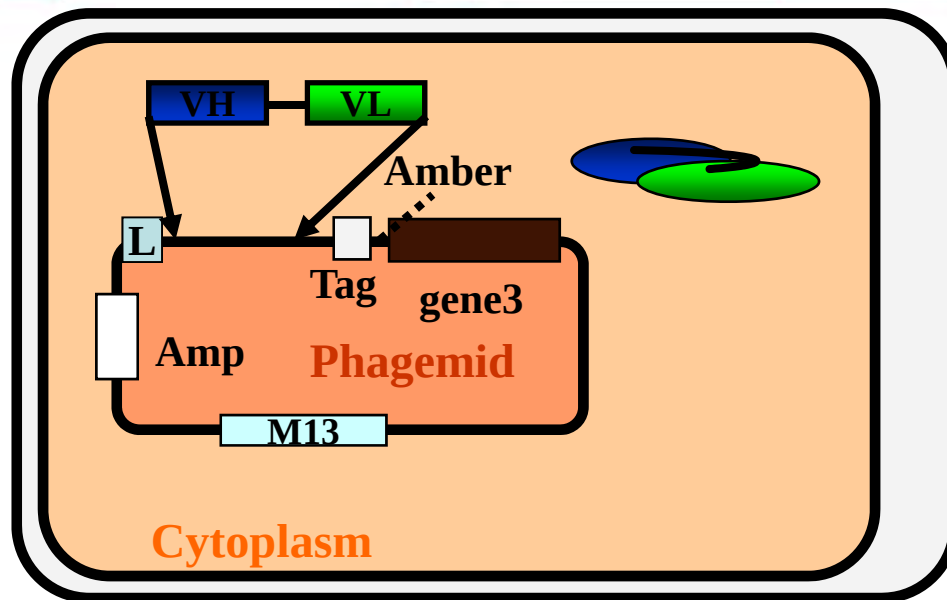
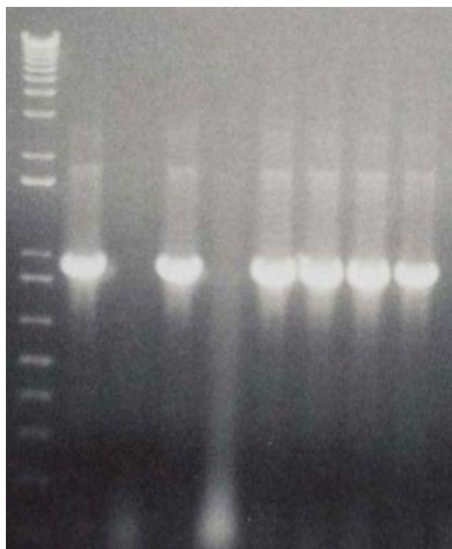
6111103

Copyright © motifollo.com

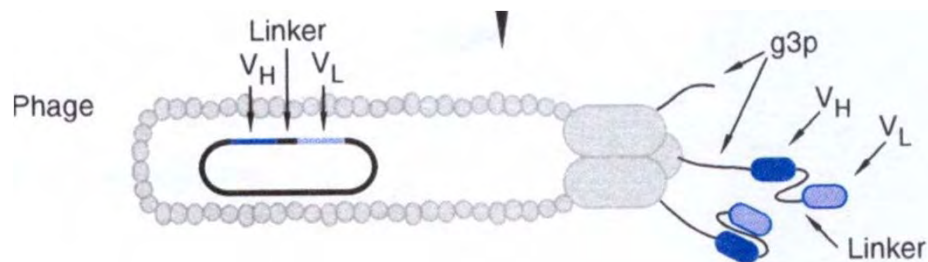
Módszer: TIL-B antitest fág megjelenítéses

scFv konstrukció:

St 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8...n



Fág megjelenített scFv
antitest fragmens:



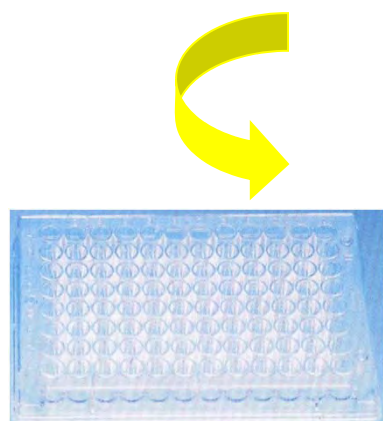
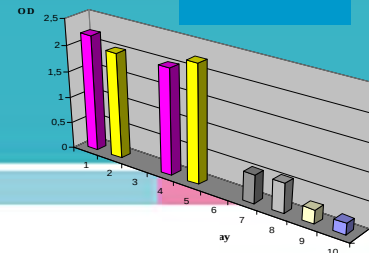
Ref: Kotlan B et al, Disease Markers, 2000

Kotlan B & M C Glassy, RT PCR Protocols, 2010

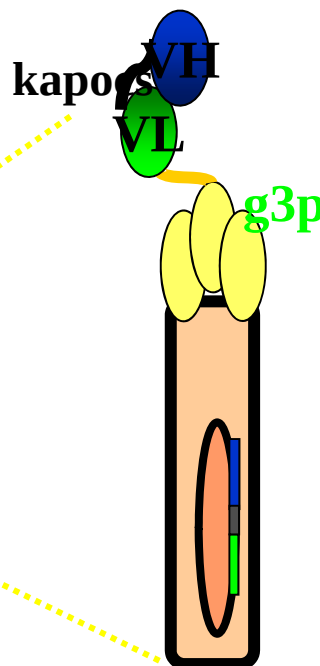
1/ ScFvk fagmid könyvtár
+ indukáló segítő fág.



ScFvk fag
könyvtár

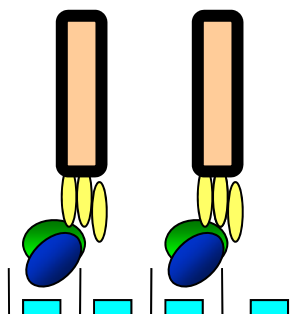
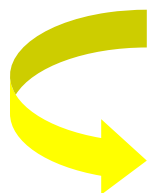


2/ „Mester tálca” -
rekombináns fág
részecskék termelése



Szelektált
ScFvk fágok

6/ ELISA
anti-M13
fág ellenes
antitest



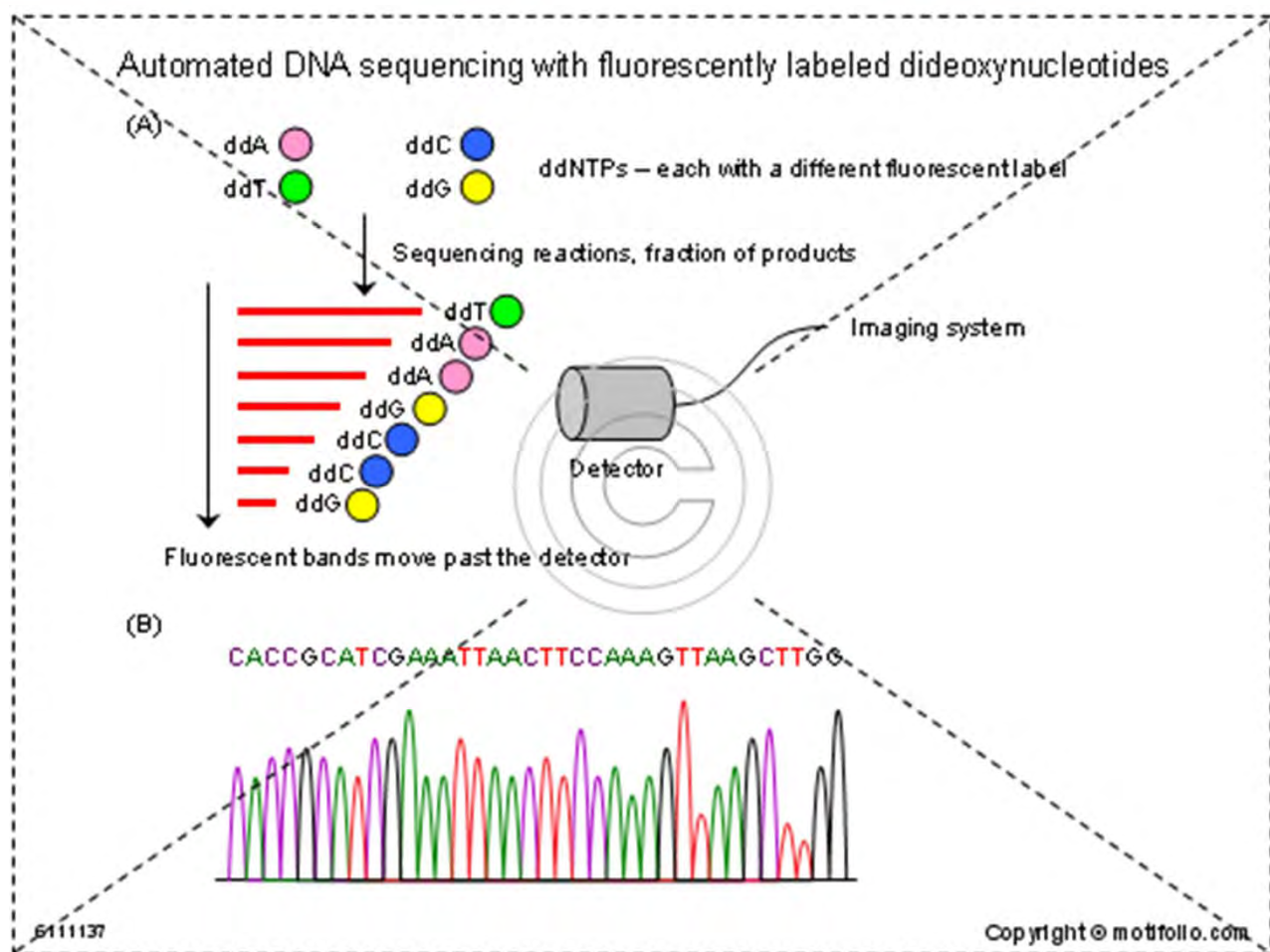
3/ Fág tartalmú felülúszok
tesztelése tumorsejt
membránokon

4/A nem kötődött fág
részecskék
eltávolítása

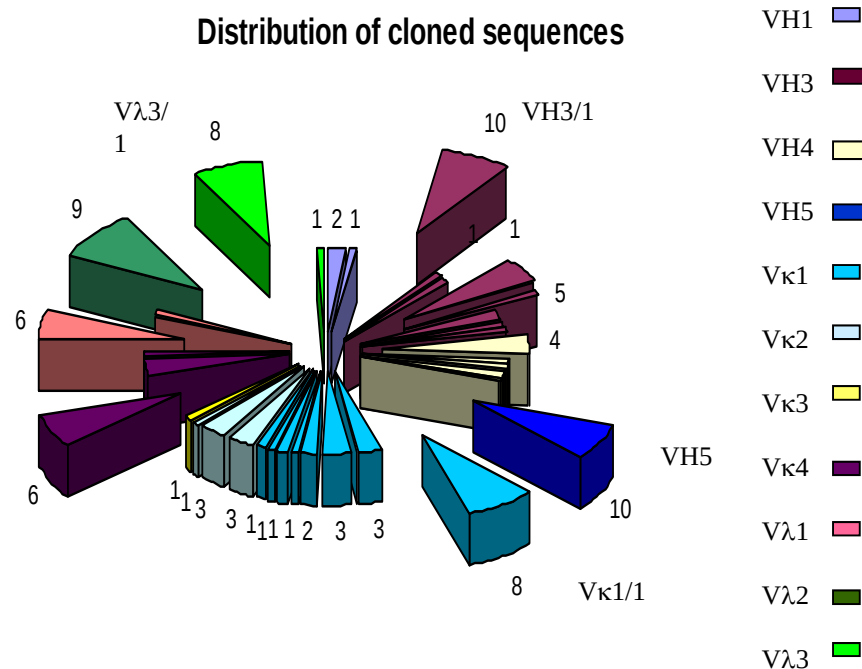


5/Tumor antigén kötő fág
részecskék kinyerése,
E.Coli bacteriumok
transzformációja.

DNS szekvenciaelemzés alapja

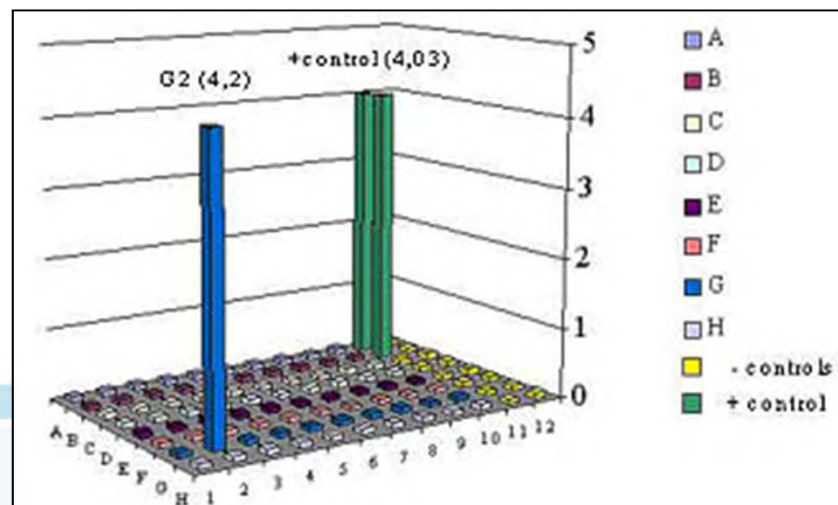


Results: „The proof of principle”



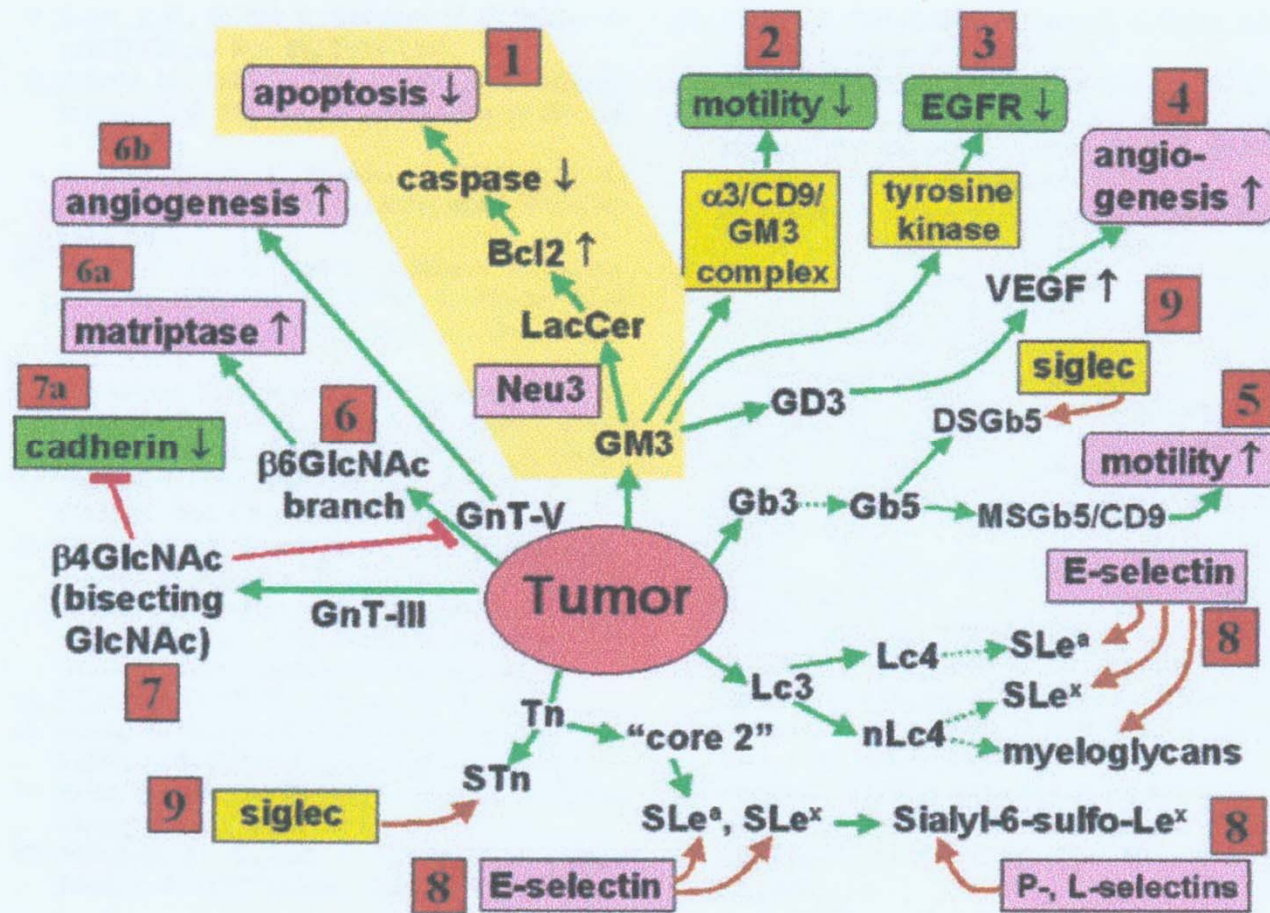
**Cut pie chart diagram :
Ig VH sequences distributed
to families and clusters**

**Tumor binder ScFvk clones
selected by Ab phage ELISA**



GD3 GANGLIOSIDOK – kulcsfontosságú tumorasszociált antigének

Az aberráns glikoziláció – és a malignus folyamatok kapcsolata

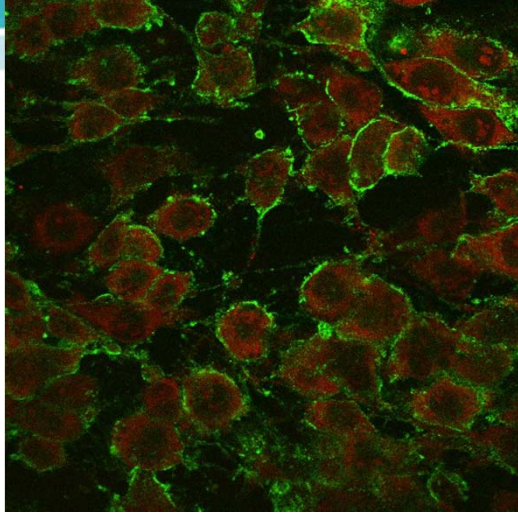


Fontos szerep:
a tumorprogresszió
fő pathofiziológiás
folyamataiban

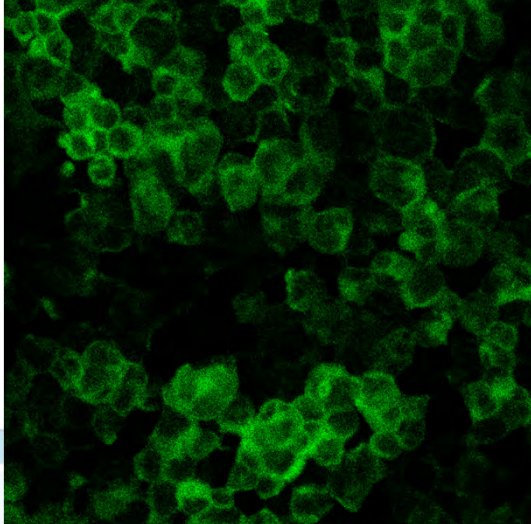
tumor invazióban
és metastazisban

apoptózis,
motilitás
angiogenesis,
adhezió
EGFR tyrosine
kinase aktivitás,
epithel sejtek

**SK Mel 28 sejttenyesztő
kamra: G2 scFv α GD3/ poz.**



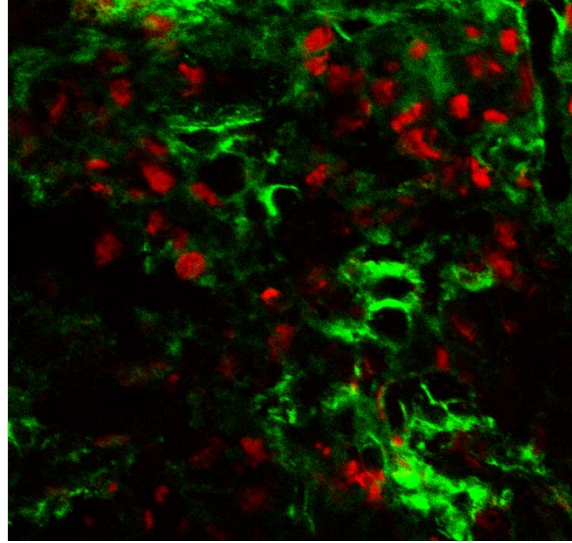
**Cytospin Inv. ductal emlő
carc.TU2/ Citocentrifuga:
G2 scFv α GD3/ pozitivitás**



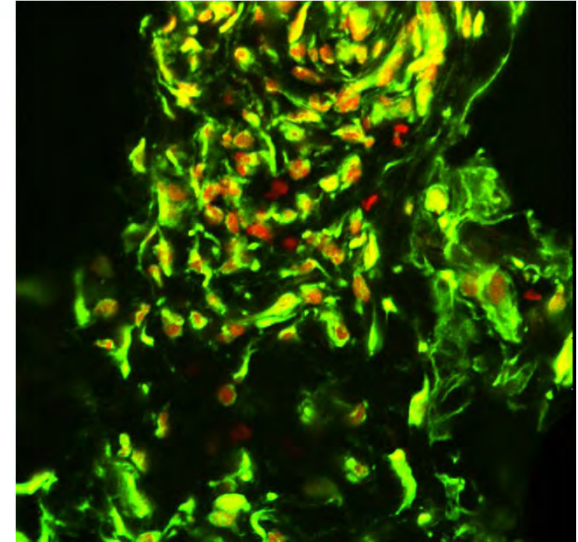
www.meetthescientist.hu

Immunofluorescencia–confocalis laser microscop

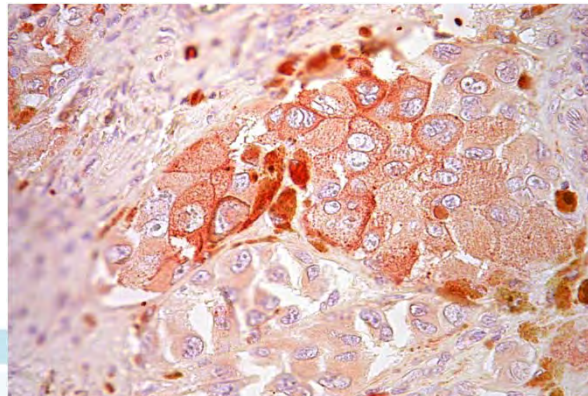
**Criostatos metszet / melanoma
szövet / α GD3 ab pozitivitás**



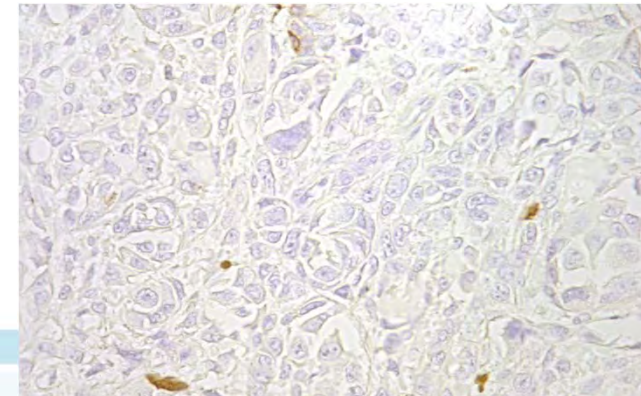
**Criostatos metszet /melanoma
M3407 G2 scFv α GD3/ poz.**



Immunhisztokémia



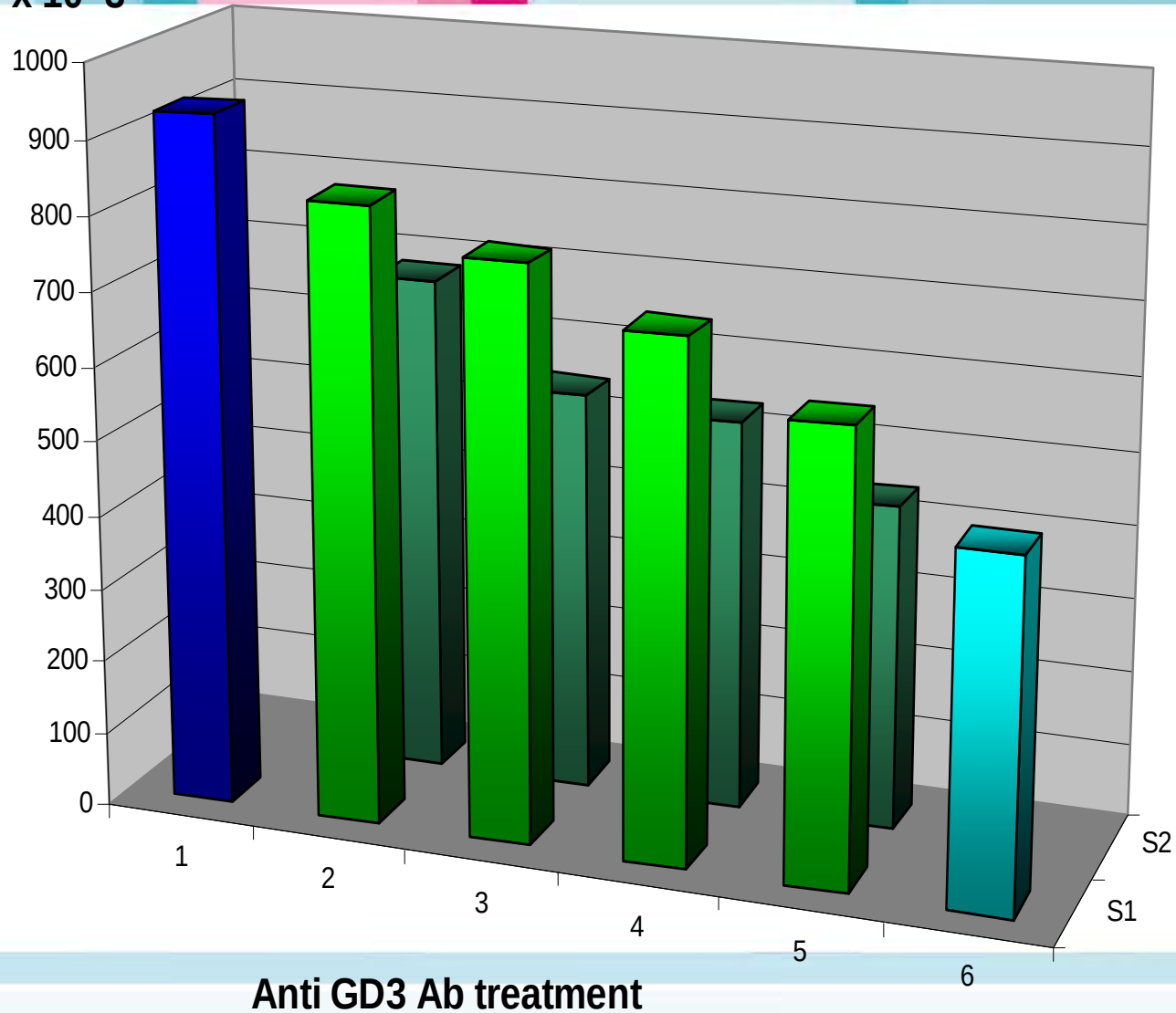
Mel 3357 GD3 Ab 200x



Mel 3357 neg control 200x

MTT proliferation - HT199 melanoma

OD $\times 10^{-3}$



KONKLÚZIÓ:

Az ektodermális eredetű tumorokban levő B sejtekből kinyert immunglobulin variabilis genregiók kulcsfontosságú tumorasszociált struktúrákat ismernek fel.

A kimutatott egyedi GD3 gangliozyd membrán antigének igen fontos szerepet játszanak a tumor növekedési és áttétképződési folyamataiban.

Ezen tulajdonságok alapján az egyedi gangliozyd struktúrákkal specifikusan reagáló ellenanyag fragmensek jó alapjai lehetnek új korai tumor diagnosztikus és célzott terápiás gyógyszerfejlesztéseknek.

Irányvonalak amelyek révén a kinyert genetikai információ a rák korai diagnosztizálását segíti és egy új, hatékony célzott rákterápiás szer kifejlesztéséhez alapot ad.

REDEFINING CANCER THERAPY



A CITIM / Budapest 2011. konferencián tárgyalt főbb rák immunterápiás lehetőségek:

- Tumor vaccinák megelőzésre és terápiára
- Antitest alapú immunterápia
- Adoptive sejtes immunterápiák és génterápiák rákban.
- Kombinációs rák terápiás lehetőségek
- Új targetek az új immunterápiás lehetőségekhez
- Új biomarkerek az immunterápiára adott válasz előrejelzéséhez

Egyéb kapcsolódó témák:

- A rák és a gyulladásos folyamatok.
- Immunregulációs sejtek és citokinek működése.
- Immuntolerancia és immune „escape” / menekülés mechanizmusa.
- A tumor mikrokönyezete.
- Rák immunmarkerek immundiagnosztikában és immun monitorizálásban

ACKNOWLEDGEMENTS:

- * Harry J Lloyd Charitable Trust,
- * Fulbright Grant No 1206103,
- * OTKA T048933
- * Rajko Medenica Research Foundation,
- * NATO CLG LST 978639
- * Eötvös XLI/34/2000,
- * OTKA T030380,
- * French Government's Scholarships
- * INSERM ,
- * IARC

Prof Dr Jozsef Timar, DSci, MD

Semmelweis University

Prof Dr Miklos Kasler, DSci, MD

Prof Dr Jozsef Toth, DSci, MD,

Prof Dr Zoltan Szentirmay, PhD, MD

Dr Gabriella Liszkay, PhD

Dr Andrea Ladanyi, PhD

National Institute of Oncology, Budapest

Prof Dr Gyozo Petranyi DSci, MD

National Blood Transfusion Service,

www.meetthescientist.hu

Prof Dr Mark C Glassy, PhD
IMSA Foundation, San Diego

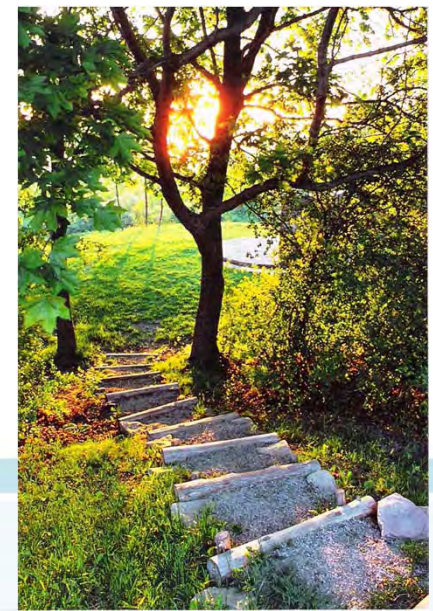
Prof Dr Mepur H Ravindranath, PhD
Terrasaki Laboratory, Los Angeles

Prof Dr Francesco M Marincola, DSci, MD
IDIS/ DTM CC/CHI, NIH, Bethesda MD

Prof Dr Rainer Fischer, PhD
RWTH, Aachen University

Prof Dr Jean-Luc Teillaud, PhD, DSci
Prof Dr Wolf H Fridman, PhD, MD
INSERM U255, UPMC, Paris

Special thanks to my sister:
Sylvia Kotlan





Köszönöm!

www.meetthescientist.hu

