

Zastosowanie agonistów EGFR i HGFR jako leków przeciwnowotworowych działających na komórki nowotworowe o określonym fenotypie

Agoniści receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) prowadzą do dimeryzacji dwóch podjednostek EGFR, natomiast agoniści receptora dla czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR, ang. *hepatocyte growth factor receptor*, nazywanego również MET) prowadzą do dimeryzacji dwóch podjednostek HGFR [Liu P, Sattler M]. Po dimeryzacji następuje fosforylacja domen C-terminalnych receptorów i aktywacja związanych z nimi kaskad sygnałnych [Herbst RS, Normanno N]. Większość mutacji EGFR prowadzi do konstytutywnej aktywacji, która jest w dużej mierze niezależna od agonistów EGFR [Kuan CT]. O mutacji takiej możemy mówić gdy pomimo braku agonisty EGFR (np. naskórkowego czynnika wzrostu – EGF, ang. *epidermal growth factor*) może dochodzić do homodimeryzacji mutantów EGFR i aktywacji szlaków sygnałnych. Dimeryzacja, jak opisano wcześniej, wywołuje autofosforylację. Niemniej jednak możliwy jest wpływ agonistów EGFR i/lub HGFR nawet na mutanty aktywujące EGFR. Wynika to z faktu, że możliwa jest heterodimeryzacja prawidłowego EGFR (EGFRwt, *wild type*) z mutantem aktywującym jak i heterodimeryzacja prawidłowego HGFR (HGFRwt, *wild type*) z mutantem aktywującym EGFR, pod warunkiem związania przez prawidłowy EGFR czy HGFR agonisty [Zeineldin R, Garnett J]. Ostatnie doniesienia podkreślają istotność heterodimeryzacji w przypadku wielu mutacji EGFR [Shan Y, Red Brewer M]. Jednak nie wszystkie mutacje EGFR prowadzą do ułatwienia homodimeryzacji mutant-mutant czy heterodimeryzacji mutant-białko prawidłowe. Część mutacji receptora powoduje jego aktywację w oparciu o inne mechanizmy, przykładowo możliwe jest zwiększenie aktywności kinazowej czy zwiększenie wrażliwości na agonistę. Możliwe są również delecje prowadzące do usunięcia domeny autoinhibicji EGFR np. EGFRvIV i EGFRvV. Opisana tu terapia, jeśli dotyczy mutantów, to określonych jako aktywujących i heterodimeryzujących mutantów EGFR, czyli takich, które chociaż mogą być aktywne pod nieobecność agonistów EGFR to ich aktywacja może być przez agonistów wzmacniana. Jest to możliwe w związku z występowaniem zjawiska heterodimeryzacja mutant – forma prawidłowa receptora związanego z agonistą/ aktywowanego agonistą.

Agoniści EGFR i HGFR to znane czynniki pobudzające wzrost i proliferację komórek [Herbst RS]. Mogą wpływać również negatywnie na programowaną śmierć komórki – apoptozę [Kuan CT]. Są to działania typowo pro-nowotworowe. W przypadku komórek nowotworowych bardzo często obserwuje się mutacje genów kodujących białka tych receptorów (częściej EGFR), które definiowane są jako aktywujące [Lynch TJ]. Mutacjami tego typu są mutacje prowadzące do powstania EGFRvIII jak również mutacje punktowe np.: V689M, L703F, A289V, R108K, T263P, G598V, L834R i L858R [Shan Y, Okabe T, Kuan CT]. Produkty genów *EGFR*, *c-MET* (gen kodujący HGFR) i ich mutantów działają poprzez szlaki sygnalizacyjne. Również geny kodujące białka działające na tych szlakach sygnalizacyjnych ulegają bardzo często mutacjom w komórkach nowotworowych.



Obserwowane są mutacje aktywujące aktywatorów tych szlaków np. RAS [Zenonos K], PIK3CA [Karakas B] i mutacje inaktywujące inhibitorów tych szlaków np. PTEN [Teng DH, Moon SH] czy NF1 [Sabova L]. Wszystkie te obserwacje doprowadziły do powstania modelu choroby nowotworowej mówiącego, że przeciwnowotworowe efekty terapeutyczne osiągnąć można dzięki blokowaniu np. receptora dla EGF czy HGF, względnie szlaków aktywowanych przez te receptory [Engelman JA]. Klasycznym już związkiem, który jest stosowany w takim ujęciu jest erlotinib – bloker kinazy tyrozynowej EGFR [Sos M, Raymond E]. Mniej znanym jest SU11274 – bloker kinazy HGFR [Comoglio PM, Sattler M]. Terapie oparte na wspomnianym modelu często nie spełniają oczekiwań co do skuteczności. Wbrew oczekiwaniom zastosowanie terapii blokujących, czy to EGFR czy HGFR, nie przynosi często spodziewanych rezultatów [Tang Z]. Olbrzymie koszty poniesione w czasie pracy nad tymi terapiami nie równoważą społecznie osiągniętych korzyści. Model, na którym bazowano opracowując te terapie zakłada, iż receptory EGFR czy HGFR wywołują jedynie działania pro-nowotworowe [Herbst RS], a ich blokowanie powoduje spowolnienie proliferacji i indukcję apoptozy, a zatem działania przeciwnowotworowe. Pojawia się jednak coraz więcej przykładów sytuacji, w których działanie HGF czy EGF, a co za tym idzie ich receptorów i kaskad sygnałnych aktywowanych przez ten receptory, wywołuje efekty niezgodne z opisanym powyżej modelem – modelem zakładającym, iż pobudzanie EGFR wywołuje zawsze przyspieszenie namnażania się komórek i ich ochronę przed śmiercią programowaną. Przykładem takiego zjawiska jest senescencja indukowana przez onkogeny (OIS, *oncogene induced senescence*) [Courtois S]. Senescencja, czyli nieodwracalne ustanie podziałów komórkowych, może zostać wywołana poprzez aktywację EGFR, HGFR, bądź niektórych szlaków transdukcji sygnałów pobudzanych przez te receptory [Courtois S]. O ile przyspieszenie proliferacji komórek ma znamiona działania pro-nowotworowego, o tyle jej nieodwracalne zahamowanie nie wykazuje już tak oczywistego działania anty-nowotworowego. Podobnie, wbrew pierwszym doniesieniom o działaniu anty-apoptocycznym agonistów EGFR i HGFR, opisano działania EGFR/HGFR czy kaskad sygnałnych szlaków tych receptorów, które mogą sprzyjać śmierci programowanej – apoptozie [Garcia R, Gunther HS, Armstrong DK]. Wywołanie śmierci komórki nowotworowej nie powinno sprzyjać procesowi nowotworowemu.

Znanych jest bardzo wiele mutantów EGFR. Ciągłe jednak ich wpływ na komórki nowotworowe nie jest w pełni wyjaśniony. Obecność EGFRvIII i mutacji punktowych odpowiadających za aktywację z możliwą heterodimeryzacją wykrywa się u pacjentów z rakiem prostaty, rakiem jelita grubego, rakiem piersi, a nawet guzami mózgu [Gan HK]. Mutacje punktowe EGFR wykrywa się częściej w rakach płuc. Bardzo często obecności EGFRvIII czy innych mutantów aktywujących heterodimeryzujących EGFR towarzyszy wysoka ekspresja EGFR będąca konsekwencją chociażby amplifikacji genu *EGFR* (amplifikacja jest tu rozumiana jako pojawienie się wielu kopii genu z powodów innych niż polisomia chromosomu 7) [Stockhausen MT]. Podobnie, obecności mutantów aktywujących heterodimeryzujących towarzyszy wysoka ekspresja HGFR (MET) będąca np. konsekwencją amplifikacji genu *c-MET* [Jun HJ]. Współdziałanie EGFRwt z EGFRvIII czy innymi mutantami typu EGFR^{MUTAKT_{HET}} oraz HGFR z tymi mutantami wynika głównie z możliwości heterodimeryzacji EGFRmutant-EGFRwt i EGFRmutant-HGFR [Red Brewer M, Zeineldin



R]. Heterodimeryzacja jest możliwa po związaniu agonisty przez prawidłowy receptor – jego monomer. Wielokrotnie obserwuje się jednak amplifikację czy to EGFR czy HGFR i nadekspresję tych receptorów bez współwystępowania mutacji *EGFR*. Można również obserwować nadekspresję czy to EGFR czy to HGFR bez amplifikacji genów kodujących te białka, której nie towarzyszy obecność mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR.

Opis patentu (szczegółowy opis wynalazku)

Niniejszy wynalazek dotyczy terapii pacjentów z chorobami nowotworowymi charakteryzującymi się obecnością komórek wykazującymi określony fenotyp. Wynalazek dotyczy terapii personalizowanej jak i celowanej. Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie agonistów EGFR i/lub HGFR jako leków przeciwnowotworowych. Przez agonistę rozumie się tutaj każdą molekułę/związek chemiczny będącą (będący) w stanie aktywować te receptory. W przypadku EGFR lista naturalnych agonistów jest długa. Są to przede wszystkim EGF a następnie TGF alpha, HB-EGF, Amfiredulina, Betacellulina, Epregeulina, Epigen [Herbst RS, Schneider MR]. Ponadto, możliwe jest opracowanie lub wykrycie kolejnych agonistów EGFR. HGFR ma jednego naturalnego agonistę w postaci HGF. Również w odniesieniu do HGFR możliwe jest działanie agonistów, które zostaną dopiero zidentyfikowane.

Wykonane przez odkrywców opisywanego tu wynalazku badania wskazują wprost na możliwość zastosowania agonistów EGFR i/lub HGFR jako związków mogących w niektórych sytuacjach spowodować zablokowanie podziałów komórek nowotworowych, a nawet ich śmierć. Przedmiotem niniejszego wynalazku jest zastosowanie agonistów EGFR i HGFR osobno, lub w kombinacji, jako związków wykazujących efekty przeciwnowotworowe u wybranych pacjentów. Jak wynika z obserwacji wnioskodawcy mogą to być po pierwsze pacjenci, u których wykryto komórki wykazujące wysoką ekspresję mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR i wysoką ekspresję EGFRwt i/lub MET. Po drugie, mogą to być pacjenci, u których wykryto komórki nowotworowe z nadekspresją jedynie EGFR lub nadekspresją jedynie HGFR, względnie nadekspresją EGFR i HGFR.

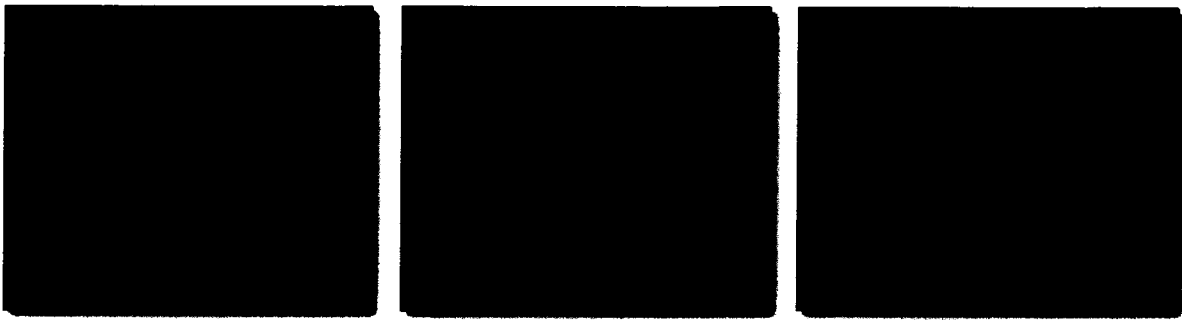
Przez wysoką ekspresję EGFR rozumie się tu ekspresję w przypadku której, po izolacji białka z komórek nowotworowych i wykonaniu analizy techniką Western Blot, zmierzony densytometrycznie stosunek prążków beta aktyny do EGFR nie jest większy niż 5.

Przez wysoką ekspresję mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR rozumie się tu ekspresję w przypadku której, po izolacji białka z komórek nowotworowych i wykonaniu analizy techniką Western Blot, densytometrycznie stosunek prążków beta aktyny do mutantu EGFR nie jest większy niż 5.

Przez wysoką ekspresję MET (HGFR) rozumie się tu ekspresję w przypadku której, po izolacji białka z komórek nowotworowych i wykonaniu analizy techniką Western Blot, zmierzony densytometrycznie stosunek prążków beta aktyny do HGFR nie jest większy niż 5.

O silnej ekspresji dowodzi również silny sygnał EGFR, MET i mutantu EGFR w badaniu immunocytochemicznym i/lub badaniu immunohistochemicznym (Ryc. 1).

 3



Ryc. 1. A. Komórki linii NCI-H460 wykazujące wysoką ekspresję EGFRvIII; B. Komórki linii MCF7 wykazujące wysoką ekspresję HGFR; C. Komórki linii MDA-MB-468 wykazujące wysoką ekspresję EGFR.

W opisie wynalazku określenie HGFR jest tożsame z określeniem HGFRwt (ang. *wild type*). Oznacza to HGFR o prawidłowej sekwencji aminokwasów. Określenie to jest również jednoznaczne z określeniem MET – inną nazwą białka HGFR. W opisie wynalazku określenie EGFR jest tożsame z określeniem EGFRwt. Oznacza to EGFR o prawidłowej sekwencji aminokwasów. W opisie wynalazku określenie nadekspresja jest tożsame z określeniem wysoka ekspresja.

Analizy przeprowadzone przez wnioskodawców dotyczące procesu heterodimeryzacji przykładowego mutantu aktywującego heterodimeryzującego (EGFRvIII) i EGFR

Przy budowie heterodimeru EGFRwt – EGFRvIII jako monomery wykorzystano:

1. EGFRwt – struktura krystalograficzna białka EGFR związanego z EGF, czyli zaktywowane białko EGFR (kod z bazy PDB: 1IVO);
2. EGFRvIII – model komputerowy utworzony w module Prime oprogramowania firmy Schrödinger.

Modele heterodimeru zostały utworzone przy pomocy modułu ZDOCK zaimplementowanego w oprogramowaniu Discovery Studio 3.5 firmy Accelrys. ZDOCK jest algorytmem do sztywnego dokowania białek; wykorzystuje szybką transformatę Fourier'a do poszukiwania wszystkich możliwych konformacji wiążących pomiędzy dokowanymi białkami. Jakość oddziaływań jest oszacowana na podstawie komplementarności powierzchni wiążącej białek oraz energii desolvatacji oraz energii elektrostatycznej. Najlepsze pozy podlegają procedurze RDOCK, podczas której następuje minimalizacja energii (CHARMM) mająca na celu ulepszenie energii oddziaływań pomiędzy dokowanymi białkami i eliminację zderzeń sterycznych pomiędzy atomami oraz przeliczenie energii elektrostatycznej i desolvatacji. Najlepsze pozy są uszeregowane wg wartości energii funkcji oszacowującej (ZRank Score).

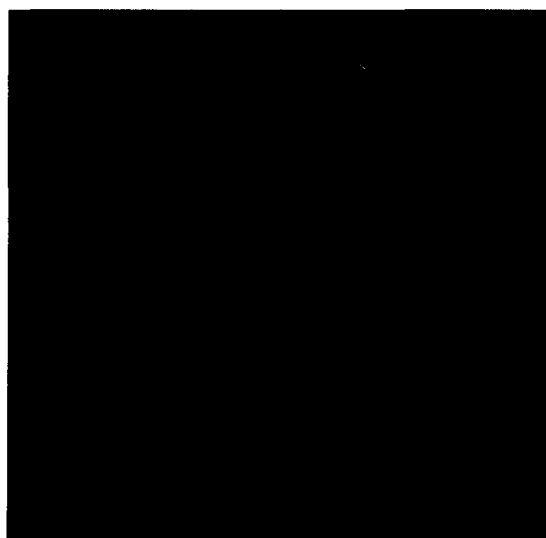
Wyniki

Najlepsze pozy przedstawione są w poniższej tabeli; pogrupowane są w dwa klastry i uszeregowane wg wartości ZDock Score. W tabeli przedstawiono również wielkości powierzchni wiążących pomiędzy białkami oraz ilości wiązań wodorowych, oddziaływań pi i mostków solnych tworzących oddziaływanie białko – białko.

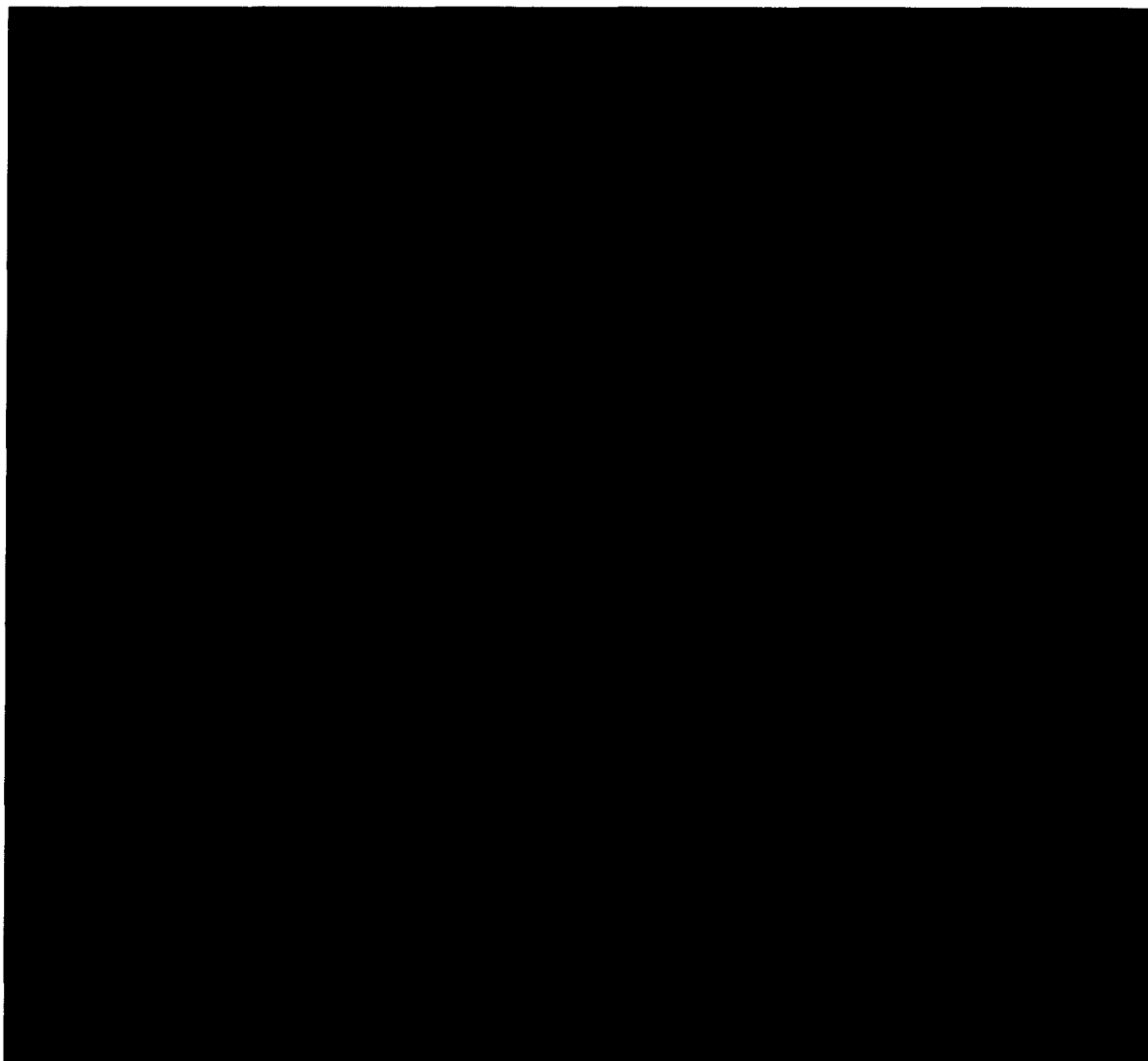
Tab. 1. Wyniki dimeryzacji przykładowego mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR (EGFRvIII) i EGFRwt.

Wyniki dimeryzacji białka wtEGFR i EGFRvIII													
receptor = wtEGFR													
ligand = EGFRvIII													
poza	ZDcoK Score	ZRank Score	klaster	rozmiar klastra	Ligand Contact Surface Area	Ligand Polar Contact Surface Area	Ligand Nonpolar Contact Surface Area	Receptor Contact Surface Area	Receptor Polar Contact Surface Area	Receptor Nonpolar Contact Surface Area	ilość wiązań wodorowych	ilość oddziaływań pi	ilość mostków solnych
Pose11			1	52	538,20	257,92	280,28	549,35	272,80	276,55	9	2	0
Pose52	44,40	-48,08	1	52	655,54	361,39	294,15	676,83	331,16	345,67	7	1	0
Pose8	43,41		1	52	613,34	338,25	275,09	621,67	304,55	317,12	6	1	1
Pose67	42,46	-44,04	1	52	606,09	289,57	316,51	622,34	308,47	313,87	5	2	0
Pose72	41,02	-43,28	1	52	544,54	276,15	268,39	545,48	302,92	242,56	11	0	2
Pose42	40,52	-51,30	1	52	452,244	209,734	242,509	450,6	258,65	191,95	5	2	0
Pose3	40,31		1	52	445,23	235,40	209,82	461,04	223,72	237,32	4	2	0
Pose36		-54,00	5	23	756,82	344,14	412,67	754,92	376,41	378,50	9	0	0
Pose17			5	23	600,68	278,81	321,87	607,54	302,33	305,21	3	0	0
Pose29		-57,23	5	23	668,52	297,82	370,70	649,25	310,23	339,02	8	0	0
Pose74		-43,07	5	23	687,85	291,27	396,58	677,87	335,93	341,94	5	1	0
Pose40		-52,04	5	23	614,80	278,27	336,53	621,69	343,73	277,96	7	1	2
Pose59	38,94	-46,31	5	23	704,17	314,79	389,38	701,22	342,63	358,59	8	1	0

Ilustracja wyników



Ryc. 2. Receptor EGF (kolor granatowy) związany z EGF (kolor szary) (na podstawie struktury krystalograficznej 1IVO).



Ryc. 3. Oddziaływania pomiędzy heterodimerem EGFRvIII i EGFRwt – poza 74 z klastra 5.

Reszty interfejsu oddziaływania zaznaczone są odpowiednio kolorem jasnoniebieskim i jasnofioletowym. Wiązania wodorowe zaznaczono zielonymi kropkami, a oddziaływania pi kolorem pomarańczowym.

Wniosek

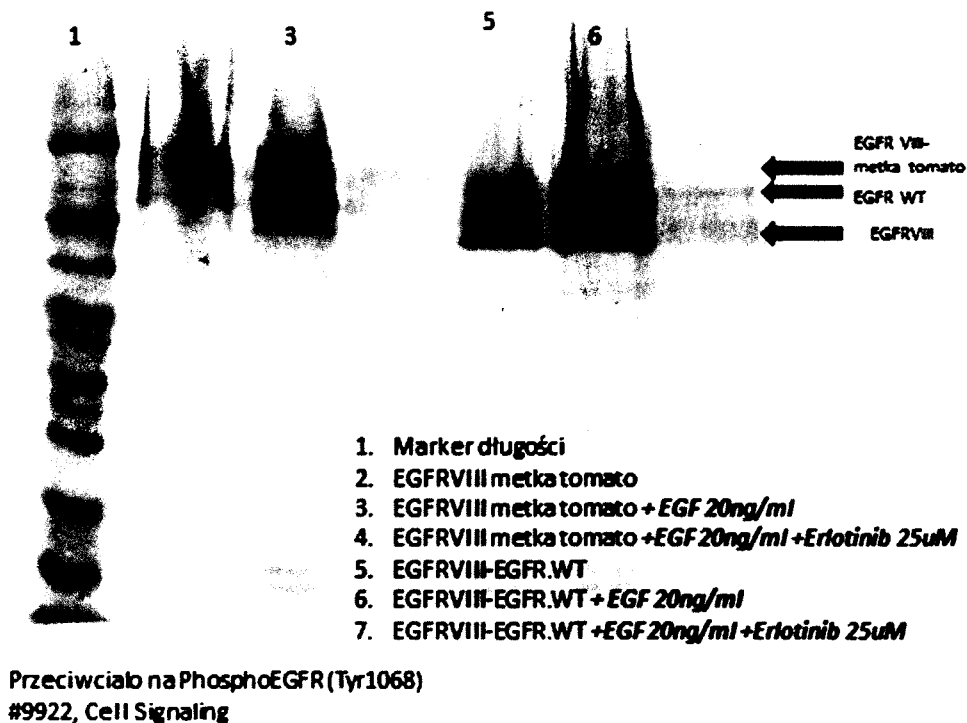
Prowadzone analizy potwierdzają możliwość heterodimeryzacji EGFRvIII i EGFR pod warunkiem przyłączenia EGF do EGFR.

Testowanie wiarygodności modelu badań

Przykładowe badanie fosforylacji metodą Western Blot wykonane zostało w celu ustalenia czy w zastosowanym modelu obserwuje się aktywację EGFR po zastosowaniu jego agonisty, a także jego blokowanie w obecności blokera tego receptora pomimo obecności agonisty. Było to badanie funkcjonalne sprawdzające wiarygodność modelu. EGFR posiada domenę o aktywności kinazy tyrozynowej i w wyniku jej aktywacji obserwuje się autofosforylację EGFR. Fosforylacja odpowiednich tyrozyn umożliwia aktywację kaskad sygnałnych. Z

drugiej strony, działanie blokera EGFR – erlotinibu oparte jest na zablokowaniu aktywności kinazy tyrozynowej tego receptora.

Badanie wykonano w celu ustalenia czy w stosowanym modelu EGF faktycznie pełni rolę agonisty EGFR (wywołuje fosforylację EGFR), natomiast erlotinib jest blockerem EGFR – prowadzi do inhibicji fosforylacji tego receptora (Ryc. 4). Analogiczne badanie wykonano dla HGF i SU11274.



Ryc. 4. Wynik badania techniką Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciw białku EGFR ufosforylowanemu w pozycji 1068. Wynik potwierdza, że EGF powoduje aktywację EGFR (jego fosforylację; ścieżka 3 i 6) podczas gdy erlotinib znosi aktywację receptora w badaniach z zastosowaniem opisywanego modelu (ścieżka 4 i 7). Wynik badania dowodzi, że model, w oparciu o który przeprowadza się badania, jest wiarygodny. Agonista dokonuje aktywacji EGFR, która to aktywacja znoszona jest przez inhibitor kinazy tyrozynowej tego receptora.

Obserwacje wnioskodawcy wykonane w oparciu o zweryfikowany pozytywnie model badań wskazują, że u pacjentów, u których wykrywa się współwystępowanie wysokiej ekspresji mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR z wysoką ekspresją EGFRwt zastosowanie agonisty EGFR może przynieść wymierne korzyści. Podobnie, u pacjentów wykazujących wysoką ekspresję EGFR^{MUTaktHET} i wysoką ekspresję MET korzyści przynieść może zastosowanie agonisty HGFR. Wreszcie, możliwe jest zastosowanie obydwu agonistów równocześnie jeśli mamy do czynienia ze współwystępowaniem ekspresji na wysokim poziomie HGFR, EGFR oraz współwystępowaniem mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Wnioskodawca uwidacznia również, że agoniści EGFR i HGFR wykazują efekt cytotoksyczny już wobec komórek, które wykazują jedynie wysoką ekspresję EGFR i/lub HGFR jednak pod warunkiem wydłużenia czasu ekspozycji i zwiększenia stężenia tych agonistów.

AM 7

Zrozumieliśmy, że zastosowanie w terapii agonistów receptorów EGFR i HGFR może być skierowane tylko przeciwko ściśle zdefiniowanym komórkom nowotworowym. Przedmiotem wynalazku jest więc przeciwnowotworowe zastosowanie agonisty EGFR i/lub HGFR wobec komórek nowotworowych wykazujących jednocześnie wysoką ekspresję mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR wraz z wysoką ekspresją EGFR i/lub HGFR (MET). Jest to więc docelowo terapia personalizowana, która może być jednak zastosowana u bardzo dużej grupy pacjentów.

Jeśli komórki wykazują wysoką ekspresję EGFR i ekspresję mutantu EGFR to agonista EGFR wywołuje w modelu eksperymentalnym blokowanie podziałów, a erlotinib znosi ten antynowotworowy wpływ agonisty EGFR. Podobnie, jeśli komórki wykazują wysoką ekspresję HGFR i ekspresję mutantu EGFR, to agonista HGFR wywołuje w modelu eksperymentalnym blokowanie podziałów, a SU11274 znosi ten antynowotworowy wpływ agonisty HGFR. Nie jest to jednak działanie charakterystyczne dla agonisty EGFR czy HGFR wobec wszystkich typów komórek. Jak pokazują wyniki badań, zastosowanie agonisty EGFR czy HGFR w odpowiednim stężeniu przy określonym czasie ekspozycji wobec komórek z np. wysoką ekspresją EGFR ale bez mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR, czy wysoką ekspresją HGFR ale bez mutantu EGFR^{MUTaktHET} prowadzić będzie w większości przypadków do pobudzenia proliferacji. Jest to wynik zgodny z danymi literaturowymi i na takich wynikach opiera się poszukiwanie leków przeciwnowotworowych blokujących działanie receptorów dla czynników wzrostu. Niemniej jednak, efekt działania agonisty EGFR czy HGFR może być inny niż pro-nowotworowy co jest zgodnie z wynikami zawartymi w opisie prezentowanego tu wynalazku. Ponadto, współwystępowanie na wysokim poziomie ekspresji EGFR i EGFR^{MUTaktHET} ma miejsce w większości przypadków, w których wykrywa się obecność tego mutantu. Taka sytuacja może występować u pacjentów z rakiem płuc, rakiem piersi, rakiem jelita grubego, rakiem prostaty i guzami mózgu. Często obecności mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR w komórkach tych nowotworów towarzyszy wysoka ekspresja EGFR i/lub MET. Właśnie wobec takich komórek agonista EGFR i HGFR stosunkowo łatwo wywołują efekt cytotoksyczny i/lub blokują proliferację komórek. Co niezwykle istotne, badani agonista nie wykazali w badaniach wnioskodawcy działania cytotoksycznego czy inhibicji proliferacji w odniesieniu do komórek prawidłowych. Wykazali, jak już wspomniano, efekt przeciwny, czyli pobudzenie proliferacji komórek prawidłowych jak i komórek nowotworowych wielu linii komórkowych. Wobec powyższego, opisana terapia może zostać zaliczona do celowanej, ale nie ze względu na to, że działa na specyficzny cel jako molekułę np. białko ale dlatego, że działa na konkretny rodzaj komórek – wykazujących konkretny fenotyp/genotyp. Na poziomie fenotypu rozumie się tu wysoką ekspresję EGFR i ekspresję mutantu EGFR. Na poziomie genotypu np. amplifikację *EGFR* i mutację genu *EGFR*. Co bardzo istotne, zablokowanie cytotoksycznych czy antyproliferacyjnych efektów wywołanych przez agonistę EGFR i/lub HGFR zostało osiągnięte dzięki zastosowaniu erlotinibu i SU11274. Jest to wynik spójny z obserwacjami cytotoksycznego działania agonisty EGFR i/lub HGFR wobec komórek o wskazanym fenotypie (wysoka ekspresja EGFR i mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR). Pokazuje to, iż związki te traktowane jako leki przeciwnowotworowe mogą w pewnych

okolicznościach sprzyjać przetrwaniu komórek nowotworowych, natomiast związki postrzegane jako pronowotworowe mogą wywrzeć efekt antynowotworowy.

Ocena wpływu agonistów EGFR i HGFR była możliwa dzięki wykorzystaniu odpowiednich linii komórkowych (wykazujących opisaną w wynalazku kombinację ekspresji EGFR, HGFR i mutantów EGFR), nowoczesnych narzędzi badawczych (pozwalających śledzić losy komórek *in vitro* w czasie rzeczywistym), a także agonistów i inhibitorów tych receptorów. Ponadto, wykonano badania funkcjonalne samych receptorów.

Działanie cytotoksyczne, antyproliferacyjne jak i promitotyczne agonisty EGFR wykazano stosując obserwacje mikroskopowe w czasie rzeczywistym komórek kilku linii charakteryzujących się wysoką ekspresją EGFRwt (bez mutacji EGFR), EGFR^{MUTAKTHET} (niski poziom EGFR), a także wysoką ekspresją EGFR^{MUTAKTHET} wraz z EGFRwt (do obserwacji wykorzystano urządzenie CT-Biostation). Podobnie, działanie cytotoksyczne, antyproliferacyjne jak i promitotyczne agonisty HGFR wykazano stosując obserwacje mikroskopowe w czasie rzeczywistym, obserwacje komórek kilku linii charakteryzujących się wysoką ekspresją HGFRwt (bez mutantu aktywującego EGFR), charakteryzujących się obecnością mutantu aktywującego EGFR i niskim poziomem HGFR, a także wysoką ekspresją HGFR i EGFR^{MUTaktHET} (do obserwacji wykorzystano urządzenie CT-Biostation). Ponadto, wykonano pomiary z wykorzystaniem urządzenia X-CELLigence pozwalającego oszacować zmiany w poziomie konfluencji komórek, a co za tym idzie ocenić wpływ związku na aktywność mitotyczną i/lub wzrost (wzrost rozumie się tu jako zwiększenie objętości) komórek. Do badań wykorzystano najnowocześniejsze narzędzia pozwalające doskonale monitorować efekty cytotoksyczne badanych związków.

Wykazano efekty działania agonistów EGFR na proliferację komórek wykazujących 1. wysoką ekspresję mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR (EGFR^{MUTaktHET}), 2. wysoką ekspresję EGFRwt i 3. wysoką ekspresję EGFR^{MUTaktHET} i wysoką ekspresję EGFRwt oraz 4. na proliferację komórek prawidłowych.

Wykazano, że zastosowanie agonisty EGFR w odniesieniu do komórek wykazujących wysoką ekspresję mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR i wysoką ekspresję EGFRwt skutkuje silnym efektem cytotoksycznym i/lub zablokowaniem proliferacji. Nie wykazano takich efektów wobec komórek wykazujących niską ekspresję EGFR, w tym komórek prawidłowych. Nie wykazano takiego efektu wobec komórek wykazujących wysoką ekspresję jedynie mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR. W przypadku tych linii agoniści EGFR wykazywali brak działania lub działanie pobudzające w niższych stężeniach (przykładowo, 10 ng/ml) a erlotinib wykazywał działanie hamujące proliferację (Tab. 2). Nie wykazano takiego efektu wobec komórek wykazujących wysoką ekspresję jedynie EGFRwt jeśli stosowano agonistów w niskim stężeniu, przykładowo 10 ng/ml. Jeśli badano komórki wykazujące jedynie wysoką ekspresję EGFR to konieczne było zastosowanie agonistów EGFR w stężeniu co najmniej 20 ng/ml i przy czasie ekspozycji dłuższym niż 48 h aby zaobserwować wyraźny efekt cytotoksyczny. Efekt cytotoksyczny wywoływany przy wyższych stężeniach i po dłuższym czasie ekspozycji był znoszony przez erlotinib.




Odpowiedni dobór linii komórkowych pozwolił wskazać cechy jakie muszą zostać spełnione aby agonista EGFR wykazał działanie przeciwnowotworowe.

Ponadto wykazano, że zastosowanie agonisty HGFR w odniesieniu do komórek wykazujących wysoką ekspresję mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i wysoką ekspresję MET (HGFRwt) skutkuje silnym efektem cytotoksycznym i/lub zablokowaniem proliferacji. Nie wykazano takich efektów wobec komórek z niską ekspresją HGFR, w tym komórek prawidłowych. Nie wykazano takiego efektu wobec komórek wykazujących wysoką ekspresję jedynie mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. W przypadku tych linii agonista HGFR wykazywał brak działania lub działanie pobudzające w niższych stężeniach. SU11274 wykazywał inhibicję proliferacji jeśli agonistę HGFR stosowano w niższych stężeniach i zablokowanie efektu cytotoksycznego zależnego od wyższych stężeń (Tab. 3). Nie wykazano takiego efektu wobec komórek wykazujących wysoką ekspresję jedynie MET (HGFRwt) jeśli stosowano agonistów w niższych stężeniach (przykładowo 10 ng/ml). Wykazano efekt cytotoksyczny HGF wobec komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFR ale nie EGFR^{MUTaktHET} jeśli stężenie agonisty wynosiło co najmniej 20 ng/ml a czas ekspozycji komórek dłuższy niż 48 h.

Efekt cytotoksyczny agonisty EGFR był znoszony przez erlotinib w liniach z wysoką ekspresją EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Efekt cytotoksyczny agonisty HGFR był znoszony w liniach z wysoką ekspresją HGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR przez SU11274. Jest to wynik potwierdzający, że za efekt cytotoksyczny w przypadku komórek z nadekspresją EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR odpowiedzialna jest aktywacja EGFR jego agonistą. Natomiast w przypadku komórek wykazujących nadekspresję mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i MET za taki efekt odpowiada aktywacja agonistą MET. Wskazuje to również, że blokery kinaz tyrozynowych EGFR (erlotinib) i MET (SU11274) mogą wywierać w pewnych okolicznościach efekty pozytywny wobec komórek nowotworowych – blokować antynowotworowe działanie endogennych ligandów EGFR i MET. Należy oczywiście pamiętać, że w wielu warunkach udowodniono pozytywny wpływ na proliferację komórek nowotworowych agonistów receptorów EGFR i HGFR [Tanaka K, Herbst RS]. Autorzy zgłoszenia uwidaczniają bowiem, iż agoniści EGFR i HGFR wykazali w większości prowadzonych na potrzeby tego wniosku badań działanie pronowotworowe (promitotyczne) wobec komórek innych niż wykazujące równoczesną nadekspresją EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR (EGFR^{MUTaktHET}) czy HGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Przykładowo, dla linii wykazujących jedynie nadekspresję EGFR wykazano promitotyczny wpływ agonisty EGFR w niższych stężeniach (Tab. 2). Dla linii wykazujących jedynie ekspresję HGFR promitotyczny wpływ agonisty HGFR w niższych stężeniach (Tab. 3). Wywołanie śmierci komórek z nadekspresją jedynie EGFR czy jedynie HGFR wymagało zastosowania agonistów tych receptorów w stężeniach wyższych niż 20 ng/ml i czasu ekspozycji dłuższego niż 48h.

W przedstawionych tutaj warunkach eksperymentalnych blokowanie wpływu agonisty EGFR wywołane przez erlotinib i agonisty HGFR przez SU11274 potwierdziło specyficzne działanie tych agonistów.



10

Poza badaniami cytotoksyczności przeprowadzono badania funkcjonalne samych receptorów EGFR, MET, a także mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Posłużono się badaniami receptorów wykazującymi związek między stopniem ich ufosforylowania a efektem cytotoksycznym. Zgodnie z danymi literaturowymi ekspozycja komórek na EGF powoduje fosforylację EGFR [Honegger AM, Hsu CY]. Dodanie erlotinibu do pożywki hodowlanej zapobiega, zgodnie z przewidywaniami, fosforylacji tego receptora i mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR [Downward J]. Badanie to przeprowadzono równolegle z badaniem cytotoksyczności. Uwidoczniono, że zastosowane molekuly, zarówno czynniki wzrostu (EGF, HGF) jak i blokery ich receptorów (erlotinib, SU11274) wykazały specyficzne efekty.

Tabelaryczne podsumowanie wyników otrzymanych podczas badań in vitro w czasie rzeczywistym

Tab. 2. Wpływ EGF i erlotinibu na badane linie komórkowe.

Typ komórek/ Zastosowany związek	Niska ekspresja EGFRwt Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja EGFRwt Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja EGFRwt i EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja EGFR ^{MUTaktHET} Niska ekspresja EGFRwt
DMSO (dimetylosulfotlenek)	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek
Agonista EGFR	Pobudzenie proliferacji/Brak efektu	Pobudzenie proliferacji/Brak efektu/Efekt cytotoksyczny w wyższych stężeniach i po dłuższym czasie ekspozycji	Zahamowanie proliferacji/Śmierć komórek	Pobudzenie proliferacji/Brak efektu
Agonista EGFR + Erlotinib	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę EGFR Zahamowanie proliferacji	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę EGFR Zahamowanie proliferacji	Zablokowanie zahamowania proliferacji Zablokowanie efektu cytotoksycznego wywołanego przez agonistę EGFR (odwrócenie efektów wywołanych przez agonistę EGFR opisanych w komórce powyżej)	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę EGFR Zahamowanie proliferacji

Tab. 3. Wpływ HGF i SU11274 na badane linie komórkowe.

Typ komórek/ Zastosowany związek	Niska ekspresja HGFRwt Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja HGFRwt Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja HGFRwt i EGFR ^{MUTaktHET}	wysoka ekspresja EGFR ^{MUTaktHET} niska ekspresja HGFR
DMSO (dimetylosulfotlenek)	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek

Agonista HGFR	Pobudzenie proliferacji/brak efektu	Pobudzenie proliferacji/brak efektu w niższych stężeniach/ Śmierć komórek w wyższych stężeniach lub po dłuższym czasie ekspozycji	Zahamowanie proliferacji/Śmierć komórek	Pobudzenie proliferacji/brak efektu
Agonista HGFR + SU11274	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR Zahamowanie proliferacji	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR Zahamowanie proliferacji	Zablokowanie zahamowania proliferacji Zablokowanie efektu cytotoksycznego wywołanego przez agonistę HGFR (odwrócenie efektów wywołanych przez agonistę HGFR opisanych w komórce powyżej)	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR Zahamowanie proliferacji

Tab. 4. Wpływ HGF i EGF na badane linie komórkowe.

Typ komórek/ Zastosowany związek	Niska ekspresja HGFR ^{wt} i EGFR ^{wt} Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja HGFR i EGFR ^{wt} Brak EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja HGFR ^{wt} i EGFR ^{wt} i EGFR ^{MUTaktHET}	Wysoka ekspresja EGFR ^{MUTaktHET} i niska ekspresja HGFR i EGFR
DMSO (dimetylosulfotlenek)	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek	Brak efektu Proliferacja komórek
Agonista HGFR/ Agonista EGFR	Pobudzenie proliferacji/brak efektu	Pobudzenie proliferacji/brak efektu niższe stężenia. Efekt cytotoksyczny w wyższych stężeniach, po dłuższym czasie ekspozycji	Zahamowanie proliferacji Śmierć komórek	Pobudzenie proliferacji/brak efektu
Agonista HGFR/ Agonista EGFR +erlotinib/SU11274	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR/EGFR Zahamowanie proliferacji	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR/EGFR Zahamowanie proliferacji	Zablokowanie zahamowania proliferacji Zablokowanie efektu cytotoksycznego wywołanego przez agonistę HGFR/EGFR (odwrócenie efektów wywołanych przez agonistę HGFR/EGFR opisanych w komórce powyżej)	Zniesienie efektu wywołanego przez agonistę HGFR/EGFR Zahamowanie proliferacji

*EGFR^{MUTaktHET} – mutant aktywujący heterodimeryzujący EGFR

1. Liu P, Cleveland TE 4th, Bouyain S, Byrne PO, Longo PA, Leahy DJ. A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(27):10861-6.
2. Sattler M, Reddy MM, Hasina R, Gangadhar T, Salgia R. The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2011;3(4):171-84.
3. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 59 (2 Suppl): 21–6.
4. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366(1):2-16.
5. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer.* 2001; 8 (2): 83–96.
6. Zeineldin R, Ning Y, Hudson LG. The Constitutive Activity of Epidermal Growth Factor Receptor vIII Leads to Activation and Differential Trafficking of Wild-type Epidermal Growth Factor Receptor and erbB2 *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2008; 58(6): 529–541.
7. Garnett J, Chumbalkar V, Vaillant B, Gururaj AE, Hill KS, Latha K, Yao J, Priebe W, Colman H, Elferink LA, Bogler O. Regulation of HGF Expression by Δ EGFR-Mediated c-Met Activation in Glioblastoma Cells. *Neoplasia.* 2013;15(1):73-84.
8. Red Brewer M, Yun CH, Lai D, Lemmon MA, Eck MJ, Pao W. Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Sep 9. [Epub ahead of print]
9. Shan Y, Eastwood MP, Zhang X, Kim ET, Arkhipov A, Dror RO, Jumper J, Kuriyan J, Shaw DE. Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell.* 2012;149(4):860-70.
10. Okabe T, Okamoto I, Tamura K, Terashima M, Yoshida T, Satoh T, Takada M, Fukuoka M, Nakagawa K. Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res.* 2007;67(5):2046-53.
11. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350 (21): 2129–39.
12. Zenonos K, Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2013;5(5):97-101.
13. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers *Cancer Res.* 2013;73(1):276-84.
14. Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpner KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J,

- Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncso P, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(23):5221-5.
15. Moon SH, Kim DK, Cha Y, Jeon I, Song J, Park KS. PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line. *Int J Oncol.* 2013;42(3):921-8.
 16. Sabova L, Kretova M, Luciakova K. New insights into the role of NF1 in cancer. *Neoplasma.* 2013;60(3):233-9.
 17. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Science.* 2007; 316 (5827): 1039–43.
 18. Sos, ML, Koker, M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, Seeger JM, Weiss J, Fischer F, Frommolt P, Michel K, Peifer M, Mermel C, Girard L, Peyton M, Gazdar AF, Minna JD, Garraway LA, Kashkar H, Pao W, Meyerson M, Thomas RK. PTEN Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR. *Cancer Research* 2009; 69 (8): 3256–3261.
 19. Raymond E, Faivre S, Armand J. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs.* 2000;60 Suppl 1:42.
 20. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7 (6): 504–16.
 21. Tang Z, Du R, Jiang S, Wu C, Barkauskas DS, Richey J, Molter J, Lam M, Flask C, Gerson S, Dowlati A, Liu L, Lee Z, Halmos B, Wang Y, Kern JA, Ma PC. Dual MET EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer, *Br J Cancer.* 2008; 99(6):911-22.
 22. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene.* 2008;27: 2801–2809.
 23. Garcia R, Franklin RA, McCubrey JA. Cell Death of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Induced by EGFR Activation in the Absence of Other Growth Factors. *Cell Cycle.* 2006;5(16):1840-6.
 24. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene.* 2008; 27: 2897–2909.
 25. Armstrong DK, Kaufmann SH, Ottaviano YL, Furuya Y, Buckley JA, Isaacs JT, Davidson NE. Epidermal growth factor-mediated apoptosis of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994;54: 5280–5283.
 26. Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* 2013 Jun 18. doi: 10.1111/febs.12393. [Epub ahead of print]

27. Stockhausen MS, Broholm H, Villingshøj M, Kirchhoff M, Gerdes T, Kristoffersen K, Kosteljanetz M, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Maintenance of EGFR and EGFRvIII expressions in an in vivo and in vitro model of human glioblastoma multiforme. *Experimental Cell Research* 2011; 317(11):1513-1526.
28. Jun HJ, Acquaviva J, Chi D, Lessard J, Zhu H, Woolfenden S, Bronson RT, Pfannl R, White F, Housman DE, Iyer L, Whittaker CA, Boskovitz A, Raval A, Charest A. Acquired MET expression confers resistance to EGFR inhibition in a mouse model of glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2012;31(25):3039-50.
29. Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*. 2009;218(3):460-6.
30. Tanaka K, Babic I, Nathanson D, Akhavan D, Guo D, Gini B, Dang J, Zhu S, Yang H, De Jesus J, Amzajerdi AN, Zhang Y, Dibble CC, Dan H, Rinkenbaugh A, Yong WH, Vinters HV, Gera JF, Cavenee WK, Cloughesy TF, Manning BD, Baldwin AS, Mischel PS. Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF- κ B pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discov*. 2011;1(6):524-38.
31. Honegger AM, Kris RM, Ullrich A, Schlessinger J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(3):925-9.
32. Hsu CY, Hurwitz DR, Mervic M, Zilberstein A. Autophosphorylation of the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor results in different effects on its tyrosine kinase activity with various peptide substrates. Phosphorylation of peptides representing Tyr(P) sites of phospholipase C-gamma. *J Biol Chem*. 1991;266(1):603-8.
33. Downward J, Parker P, Waterfield MD. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1984;311(5985): 483-5.

Przykłady

Analiza w oparciu o metody obrazowe (CT-Biostation)

Przykład 1. W celu sprawdzenia terapeutycznego efektu agonisty EGFR wykonano następujący eksperyment. Badano 4 rodzaje komórek w obecności podstawowego agonisty EGFR:

Badanie agonisty EGFR – EGF

- Wykazujące niski poziom EGFR i brak ekspresję mutantu aktywującego EGFR (testowano EGFRvIII)
- Wykazujące wysoki poziom EGFR i brak EGFRvIII
- Wykazujące wysoki poziom EGFRvIII i niską ekspresję EGFR
- Wykazujące wysoki poziom EGFR i wysoki poziom EGFRvIII

Komórki umieszczono w adherentnych naczyniach hodowlanych 6-dołkowych. Aby odtworzyć wynik należy postępować zgodnie z poniższymi zaleceniami. Zalecenia wykonano dla wszystkich w/w 4 linii komórkowych:

Dzień 1

- Komórki w konfluencji do 90% przepłukać buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć PBS.
- Następnie komórki odkleić od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1X) w czasie 1-3 min w $37^{\circ}C$.
- Komórki przenieść do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawiesić w pożywce DMEM z wysokim stężeniem glukozy z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
- Zliczyć komórki.
- Dodać 5×10^4 komórek na dołek adherentnej płytki 6-dołkowej.
- Uzupełnić w/w pożywką i pozostawić na ok. 12 godzin.

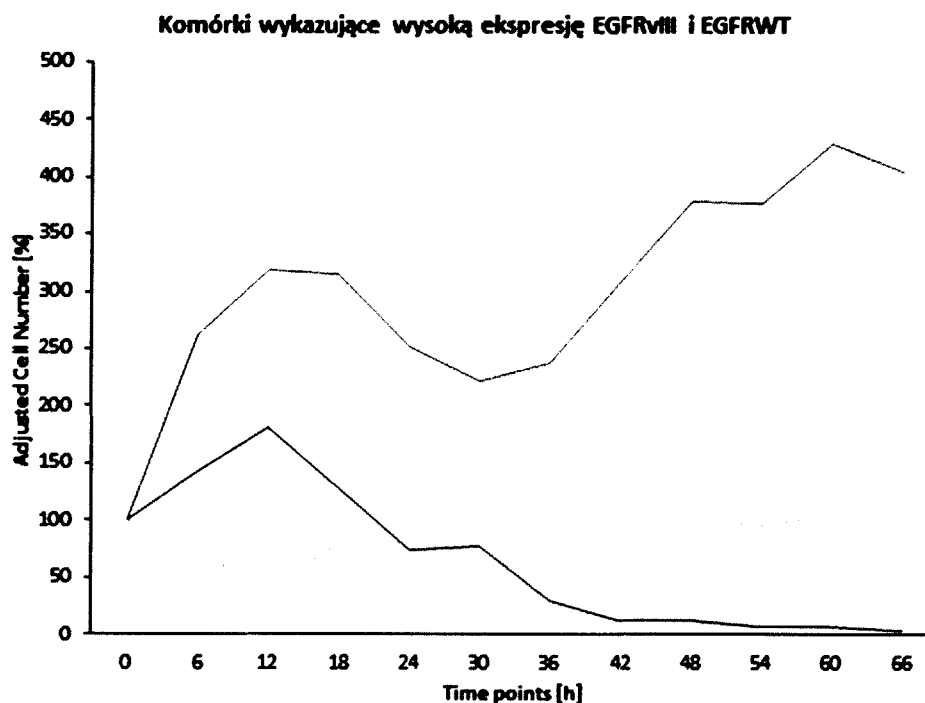
Dzień 2

- Komórki przemyć 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć dokładnie PBS każdorazowo.
- Dodać 2,5 ml uprzednio przygotowanej pożywki z odpowiednimi związkami (patrz niżej). Przygotować pożywkę DMEM z wysokim stężeniem glukozy z antybiotykami bez surowicy.
Naczynie A – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek: DMSO (1,5 μ l/1 ml) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie B – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek EGF (10 ng/ml), w 5 ml DMEM z wysoką stężeniem glukozy wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie C – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek EGF (10 ng/ml) i Erlotinib (15 μ M) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
- Wstawić naczynie z komórkami do CT-Biostation. Opisać płytkę i każdy dołek.
- Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych.

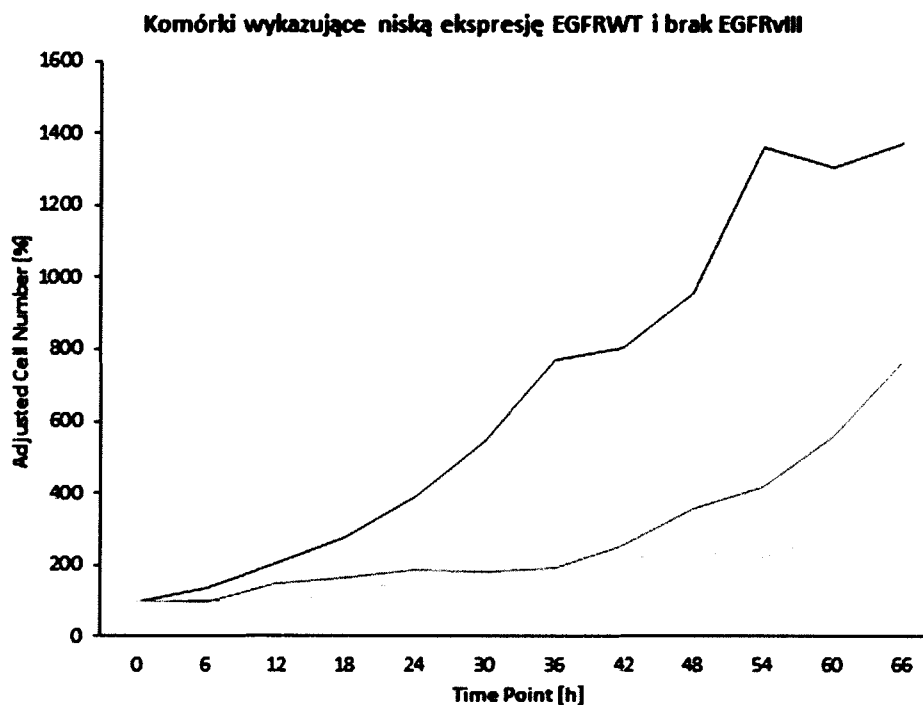
Kolejne dni

- Co 24 godziny zmieniać pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/Erlotinibu do odpowiednich naczyń powyżej określonych jako A, B i C.

12. Wstawić komórki do CT-Biostation.
13. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych. Oprogramowanie CT-Biostation pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
14. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że CT-Biostation umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.



Ryc. 5. Wpływ DMSO, EGF (10 ng/ml) a także kombinacji EGF (10ng/ml) / Erlotinib (15 μ M) na komórki wykazujące wysoką ekspresję mutanta aktywującego EGFR (EGFRvIII) i EGFRwt. Oś X – czas; oś Y –liczba komórek; linia czerwona – komórki pod wpływem EGF; linia niebieska – komórki pod wpływem DMSO; linia zielona – komórki pod wpływem EGF i Erlotinibu.



Ryc. 6. Wpływ DMSO, EGF (10ng/ml) a także kombinacji EGF (10ng/ml) / Erlotinib (15 μ M) na komórki wykazujące niską ekspresję EGFRwt i brak EGFRvIII. Oś X – czas; oś Y – liczba komórek; linia czerwona – komórki pod wpływem EGF; linia niebieska – komórki pod wpływem DMSO; linia zielona – komórki pod wpływem EGF i Erlotinibu.

Obserwacje

W warunkach kontrolnych komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFRvIII i EGFRwt namnażają się (niebieska linia). Agonista EGFR wywołuje śmierć (wywołuje efekt cytotoksyczny) komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRvIII i EGFRwt *in vitro* (czerwona linia). Dodanie Erlotinibu wraz z EGF do komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRvIII i EGFRwt powoduje zniesienie cytotoksycznego efektu EGF (zielona linia).

Podsumowanie wyników

AD. a

Komórki wykazujące niski poziom EGFR i brak EGFRvIII

Po dodaniu EGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niski poziom EGFR i brak EGFRvIII obserwowano przejściowo niewielkie pobudzenie proliferacji w porównaniu z komórkami eksponowanymi na DMSO. Dodanie Erlotinibu wraz z EGF do tych komórek nie wywoływało w opisanych warunkach żadnych efektów.

Ad. b

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i brak EGFRvIII

Komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFRwt i brak EGFRvIII eksponowane na DMSO ulegały podziałom w czasie obserwacji. Po dodaniu EGF do hodowli tych komórek obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. Erlotinib zniósł ten efekt – zniósł wzmocnienie proliferacji indukowane przez

EGF. Jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem działania czynników wzrostu. Czynniki wzrostu wzmagają proliferację a blokowanie jego receptora uniemożliwia proliferację komórek.

Ad. c

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFRvIII i niski poziom EGFRwt

Po dodaniu EGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niską ekspresję EGFRwt i wysoki poziom mutanta EGFRvIII obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. Erlotinib znosił ten efekt – znosił wzmocnienie proliferacji indukowane przejściowo przez EGF. Jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem działania czynników wzrostu. Czynniki wzrostu wzmagają proliferację. Blokowanie jego receptora uniemożliwia proliferację komórek.

Ad. d

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFRwt i EGFRvIII

Po dodaniu EGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i EGFRvIII obserwowano bardzo krótkotrwałą (3 godziny) proliferację komórek. Po kilku godzinach widoczne było silne zahamowanie proliferacji i śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i EGFRvIII, a eksponowanych na EGF. Dodanie do hodowli tych komórek Erlotinibu wraz z EGF znosiło antymitotyczne działanie EGF. Komórki wykazujące wysoki poziom EGFRwt i EGFRvIII eksponowane na EGF i Erlotinib nie namnażały się tak szybko jak w warunkach kontrolnych, to jest po dodaniu DMSO ale nie był obserwowany efekt cytotoksyczny.

Przykład 2. W celu sprawdzenia terapeutycznego efektu agonisty EGFR – Betaceluliny (BTC) wykonano następujący eksperyment:

Badanie agonisty EGFR – Betaceluliny (BTC)

Badano 4 rodzaje komórek w obecności podstawowego agonisty EGFR:

- a. Wykazujące niski poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- b. Wykazujące wysoki poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- c. Wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego EGFR i niską ekspresję EGFR
- d. Wykazujące wysoki poziom EGFR i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Komórki umieszczono w adherentnych naczyniach 6-dołkowych. Aby odtworzyć wynik należy postępować zgodnie z poniższymi zaleceniami. Zalecenia wykonano dla wszystkich 4 linii komórkowych. W celu wykonania eksperymentu dla każdej z 4 linii hodowlanych przygotowano 3 dołki z komórkami (w sumie 12 dołków):

Dzień 1

1. Komórki w konfluencji do 90% przepłukać buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć PBS.
2. Następnie komórki odkleić od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1X) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przenieść do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawiesić w pożywce DMEM z wysokim stężeniem glukozy z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczyć komórki.

5. Dodać 5×10^4 komórek na dołek adherentnej płytki 6-dołkowej.
6. Uzupełnić w/w pożywką i pozostawić na ok. 12 godzin.

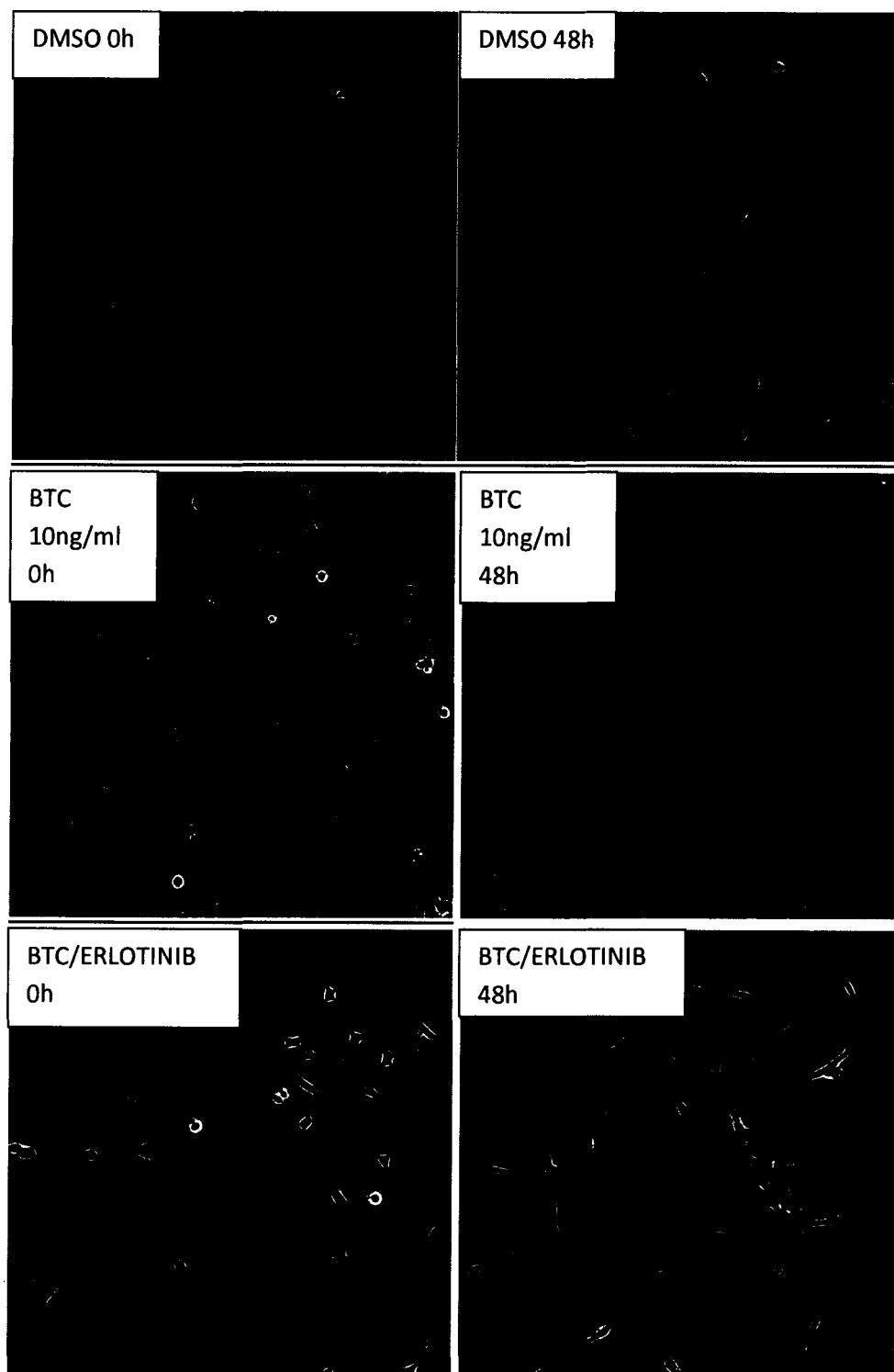
Dzień 2

7. Komórki przemyć 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodać 2,5 ml uprzednio przygotowanej pożywki z odpowiednimi związkami (patrz niżej). Przygotować pożywkę DMEM z wysokim stężeniem glukozy z antybiotykami bez surowicy.
Naczynie A – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek: DMSO (1,5 μ l/1 ml) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie B – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek BTC (10 ng/ml), w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie C – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek BTC (10 ng/ml) i Erlotinib (15 μ M) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
9. Wstawić naczynie z komórkami do CT-Biostation. Opisać płytkę i każdy dołek.
10. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych.

Kolejne dni

11. Co 24 godziny zmieniać pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/BTC/Erlotinibu do odpowiednich naczyń powyżej określonych jako A, B i C.
12. Wstawić komórki do CT-Biostation.
13. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych. Oprogramowanie CT-Biostation pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
14. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że CT-Biostation umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

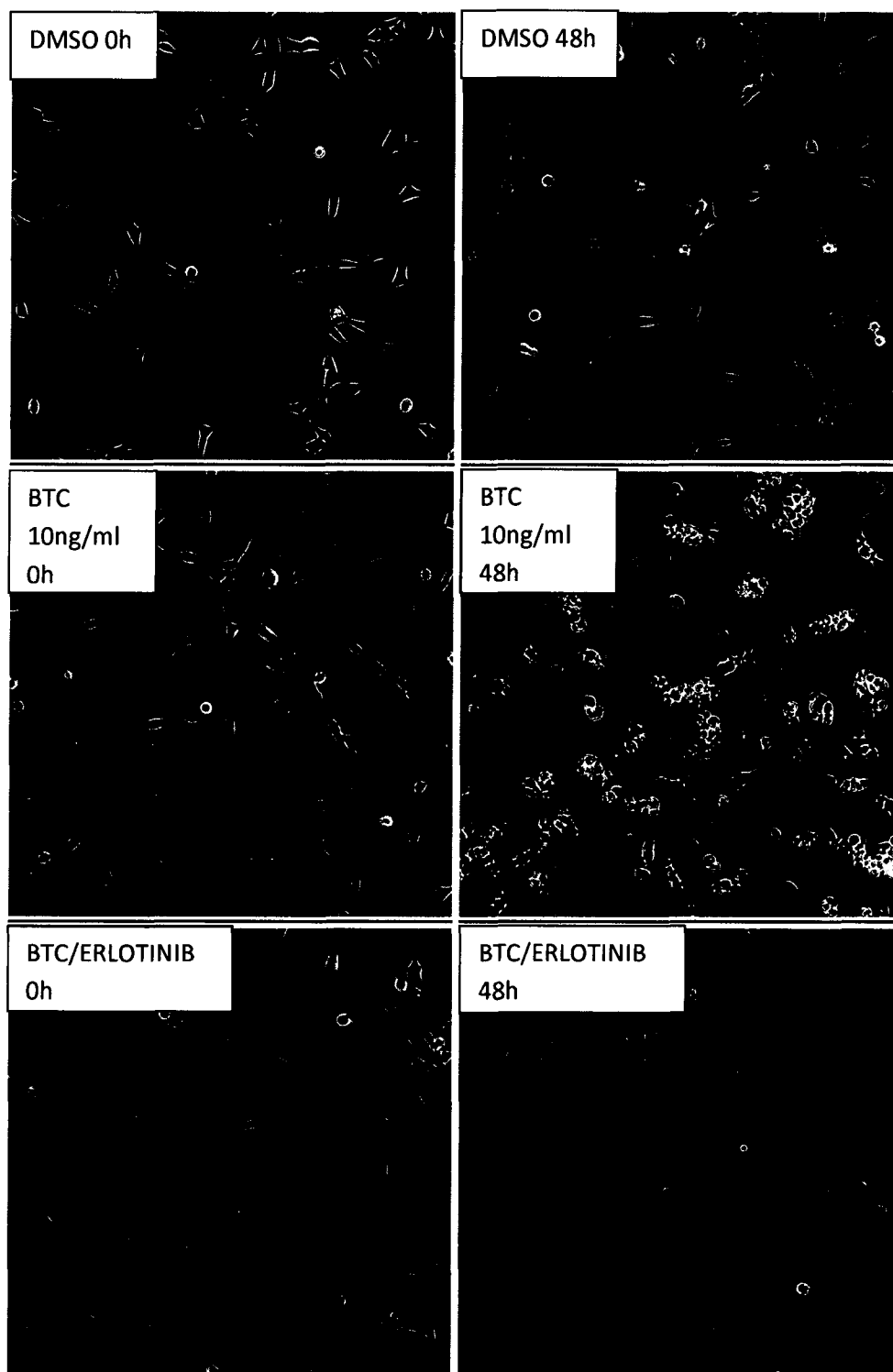
Poniżej przedstawiono wpływ badanych substancji na komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFRwt i brak mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR.



Ryc. 7. Betacelulina (BTC) w stężeniu 10 ng/ml nasila proliferację komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFR przy braku mutanta aktywującego EGFR natomiast Erlotinib znosi ten efekt.

Poniżej przedstawiono wpływ badanych substancji na komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFRwt i mutanta aktywującego EGFR.

*AM*²¹



Ryc. 8. Betacelulina (BTC) w stężeniu 10 ng/ml wywołuje śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i mutantu aktywującego EGFR. Erlotinib znosi ten efekt wywołowany przez BTC.

Podsumowanie wyników

AD. a

Komórki wykazujące niski poziom EGFR i brak mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR

[Handwritten signature]

Po dodaniu BTC w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niski poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo niewielkie pobudzenie proliferacji w porównaniu z komórkami eksponowanymi na DMSO. Dodanie Erlotinibu wraz z BTC do tych komórek nie wywoływało w opisanych warunkach wyraźnego efektów.

Ad. b

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu BTC w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. Erlotinib znosił ten efekt – znosił wzmocnienie proliferacji indukowane przez BTC. Jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem działania czynników wzrostu. Czynniki wzrostu wzmagają proliferację a blokowanie jego receptora uniemożliwia proliferację komórek.

Ad. c

Komórki wykazujące wysoki poziom ekspresji mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niski poziom EGFR

Po dodaniu BTC w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niską ekspresję EGFRwt i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR nie obserwowano wyraźnego efektu. Erlotinib nie wykazywał wyraźnego efektu w odniesieniu do tych komórek eksponowanych na BTC.

Ad. d

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Widoczne było zahamowanie proliferacji i śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR, a eksponowanych na BTC w stężeniu 10 ng/ml. Erlotinib podany wraz z BTC do tej hodowli znosiło cytotoksyczne działanie BTC. Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i mutanta aktywującego EGFR eksponowane na BTC i erlotinib zachowują się podobnie jak w warunkach kontrolnych to jest po dodaniu DMSO.

Przykład 3. Przykład przedstawia badanie wpływu agonisty receptora MET – HGF. Badanie wykonano za pomocą pomiaru potencjału powierzchniowego komórek. W celu ustalenia w jaki sposób HGF wpłynie na proliferację badanych linii komórkowych zastosowano urządzenie X-CELLigence. W tym przypadku, zgodnie ze specyfikacją urządzenia X-CELLigence, dokonywano pomiaru konduktancji wywoływanej przez komórki hodowane w monowarstwie.

Badano 4 rodzaje komórek w obecności agonisty MET (HGFR) tj. HGF:

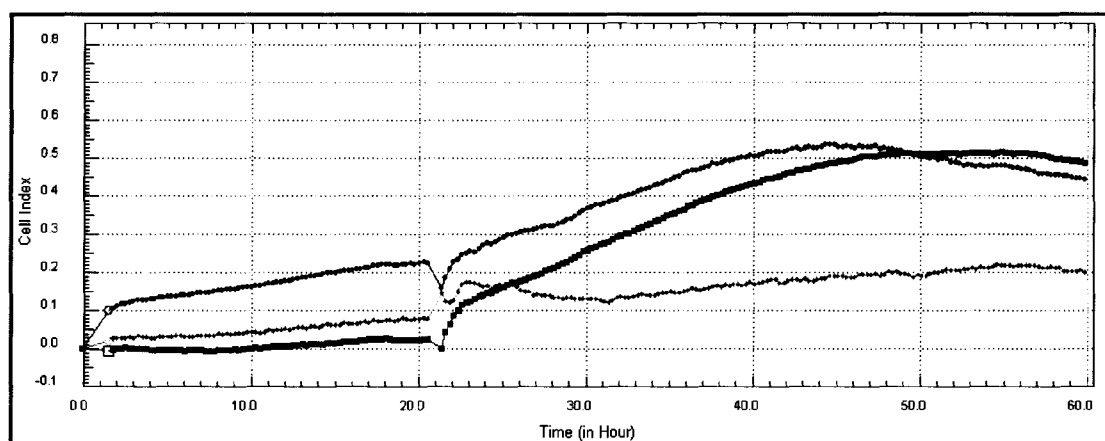
- a. Wykazujące niski poziom MET i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- b. Wykazujące wysoki poziom MET i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- c. Wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niski poziom MET
- d. Wykazujące wysoki poziom MET i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Komórki umieszczono w naczyniach 16-dołkowych przeznaczonych do urządzenia X-CELLigence. W celu wykonania eksperymentu dla każdej z 4 linii hodowlanych przygotowano 3 dołki z komórkami

(w sumie 12 dołków). Protokół postępowania jest identyczny dla każdej z linii, aby odtworzyć wynik należy postępować zgodnie z poniższymi zaleceniami. Procedurę wykonano dla wszystkich 4 linii komórkowych.

1. Komórki w konfluencji do 70% (koniecznie w fazie logarytmicznej, nie końcowej) przepłukać buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć PBS.
2. Następnie dodać Trypsyny-EDTA (0,05%, 1a), 3 min w $37^{\circ}C$.
3. Wirować (1100 rpm, 7 min).
4. Odciągnąć supernatant i bardzo dokładnie zawiesić w pożywce DMEM z wysokim stężeniem glukozy i 10% surowicą bydlęcą dodając w pierwszej kolejności 300 μl a następnie 1800 μl pożywki.
5. Zliczyć komórki używając automatycznego licznika komórek ADAM bądź komory Bürkera.
6. Dodać 1×10^4 komórek na dołek płytki 16-dołkowej E-Plate VIEW 16 (Roche). W tym celu przenieść do probówki typu eppendorf odpowiednią ilość zawiesiny komórek (zawierającą wymaganą ilość komórek na wszystkie dołki do analizy) i uzupełnić pożywką do wymaganej objętości (200 μl pożywki z komórkami/dołek).
7. Ustawić program RTCA Software (zgodnie z protokołem X-celligence) i skalibrować płytkę z pożywką bez surowicy. Ustawić krok 2 (*step 2*) na 80h.
8. Usunąć pożywkę bez surowicy i dodać komórki w pożywce z surowicą. Komórki każdej z testowanych linii dodać do 3 dołków w płytce 16-dołkowej. Przygotować eksperyment w 2-3 powtórzeniach.
9. Uruchomić program i po 6-8h (po przyklejeniu się komórek ale w fazie logarytmicznego wzrostu) wymienić pożywkę na pożywkę bez surowicy i dodać: DMSO (dodać taką objętość DMSO w jakiej dodaje się SU11274, czyli 1,5 $\mu l/ml$ medium), HGF (10 ng/ml), SU11274 (15 μM).
10. Po ogrzaniu płytki uruchomić drugi krok (*step 2*) i przejść do obserwacji wykresów. Po zakończeniu kroku 2 eksportować zapisany *run* i usunąć płytki z urzędzenia.

Przykładowe obserwacje

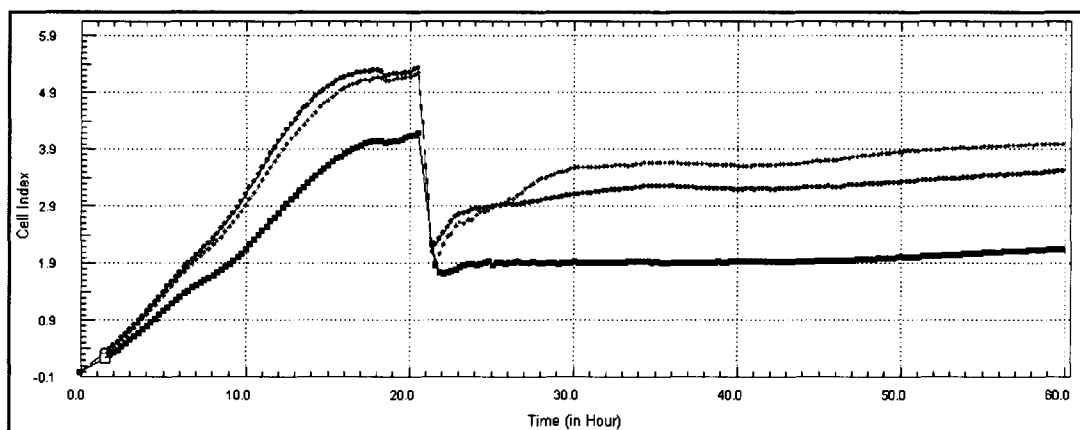


Ryc. 9. Wynik badania linii wykazującej wysoką ekspresję HGFRwt i wysoką ekspresję EGFR^{MUTaktHET}. Linia czerwona – komórki wykazujące wysoką ekspresję HGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR nie były eksponowane ani na HGF ani na SU11274, a jedynie na DMSO. Linia zielona – komórki wykazujące wysoką ekspresję HGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR były eksponowane na HGF (10 ng/ml). Linia niebieska – komórki wykazujące wysoką ekspresję HGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR były eksponowane na SU11274 i HGF (10 ng/ml). Moment dodania substancji: 21 godzina eksperymentu (gwałtowne obniżenie oporności). Oś Y – „Cell indeks” wartości rosnące

wynikają ze zmiany w rezystencji celi pomiarowej wywołanej wzrostem liczby i powierzchni zajmowanej w celi przez komórki. Oś X – czas przeprowadzonej analizy.

Obserwacje

Widoczne jest zahamowanie proliferacji komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFRwt i mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR eksponowanych na HGF w stężeniu 10 ng/ml. Dodanie do hodowli tych komórek SU11274 wraz z HGF znosi antymitotyczne działanie HGF. Komórki eksponowane na HGF zachowują się podobnie jak w warunkach kontrolnych (po dodaniu DMSO).



Ryc. 10. Wynik badania linii wykazującej wysoką ekspresję HGFRwt (bez EGFR^{MUTaktHET}). Linia czerwona – komórki wykazującej wysoką ekspresję HGFRwt (bez mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR) nie były eksponowane ani na HGF ani na SU11274. Linia zielona – komórki wykazującej wysoką ekspresję HGFRwt (bez mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR) były eksponowane na HGF (10 ng/ml). Linia niebieska – komórki wykazującej wysoką ekspresję HGFRwt (bez mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR) były eksponowane na SU11274 i HGF (10 ng/ml). Moment dodania substancji 21 godzina eksperymentu (gwałtowne obniżenie oporności- konduktancji). Oś Y – „Cell indeks” wartości rosnące wynikają ze zmiany w rezystencji celi pomiarowej wywołanej wzrostem liczby i powierzchni zajmowanej w celi przez komórki. Oś X – czas przeprowadzonej analizy.

Podsumowanie wyników

AD. a

Komórki wykazujące niski poziom MET i brak mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu HGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niski poziom MET i brak mutantu aktywującego EGFR obserwowano przejściowo niewielkie pobudzenie proliferacji w porównaniu z komórkami eksponowanymi na DMSO. Dodanie SU11274 wraz z HGF do tych komórek nie wywoływało w opisanych warunkach efektów.

Ad. b

Komórki wykazujące wysoki poziom MET i brak mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu HGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFRwt i brak mutantu aktywującego EGFR obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. SU11274 znosił ten efekt, to jest znosił wzmocnienie proliferacji indukowane przez HGF. SU11274 hamował proliferację tych komórek. Komórki poddane działaniu SU11274 praktycznie nie ulegały podziałom po dwóch godzinach od dodania tego związku. Jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem

działania czynników wzrostu. Czynniki wzrostu wzmaga proliferację. Blokowanie jego receptora uniemożliwia proliferację komórek.

Ad. c

Komórki wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niski poziom MET

Komórki te wykazywały zdolność do proliferacji w warunkach kontrolnych. Po dodaniu HGF w stężeniu 10 ng/ml do hodowli obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. SU11274 znosił ten efekt – znosił wzmocnienie proliferacji indukowane przejściowo przez HGF. SU11274 hamował skutecznie proliferację.

Ad. d

Komórki wykazujące wysoki poziom MET i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Widoczne było zahamowanie proliferacji komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR, a eksponowanych na HGF w stężeniu 10 ng/ml. Dodanie do hodowli tych komórek SU11274 wraz z HGF znosiło antymitotyczne działanie HGF. Komórki wykazujące wysoki poziom MET i mutanta aktywującego EGFR eksponowane na HGF i SU11274 zachowują się podobnie jak w warunkach kontrolnych to jest po dodaniu DMSO.

Przykład 4. W celu sprawdzenia terapeutycznego efektu agonisty EGFR – EGF wykonano następujący eksperyment:

Badanie agonisty EGFR – EGF

Badano 4 rodzaje komórek w obecności podstawowego agonisty EGFR:

- a. Wykazujące niski poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- b. Wykazujące wysoki poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- c. Wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niską ekspresję EGFR
- d. Wykazujące wysoki poziom EGFR i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Komórki umieszczono w adherentnych naczyniach 6- dołkowych. Aby odtworzyć wynik należy postępować zgodnie z poniższymi zaleceniami. Zalecenia wykonano dla wszystkich 4 linii komórkowych. W celu wykonania eksperymentu dla każdej z 4 linii hodowlanych przygotowano 3 dołki z komórkami (w sumie 12 dołków).

Dzień 1

1. Komórki w konfluencji do 90% przepłukać buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć PBS.
2. Następnie komórki odkleić od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1X) w czasie 1-3 min w $37^{\circ}C$.
3. Komórki przenieść do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawiesić w pożywce DMEM z wysokim stężeniem glukozy z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczyć komórki.
5. Dodać 5×10^4 komórek na dołek adherentnej płytki 6-dołkowej.



6. Uzupełnić w/w pożywką i pozostawić na ok. 12 godzin.

Dzień 2

1. Komórki przemyć 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć dokładnie PBS każdorazowo.
2. Dodać 2,5 ml uprzednio przygotowanej pożywki z odpowiednimi związkami (patrz niżej). Przygotować pożywkę DMEM z wysokim stężeniem glukozy z antybiotykami bez surowicy.
Naczynie A – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek: DMSO (1,5 μ l/1 ml) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie B – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek EGF (50 ng/ml), w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie C – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek EGF (50 ng/ml) i Erlotinib (15 μ M) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
3. Wstawić naczynie z komórkami do CT-Biostation. Opisać płytkę i każdy dołek.
4. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych.

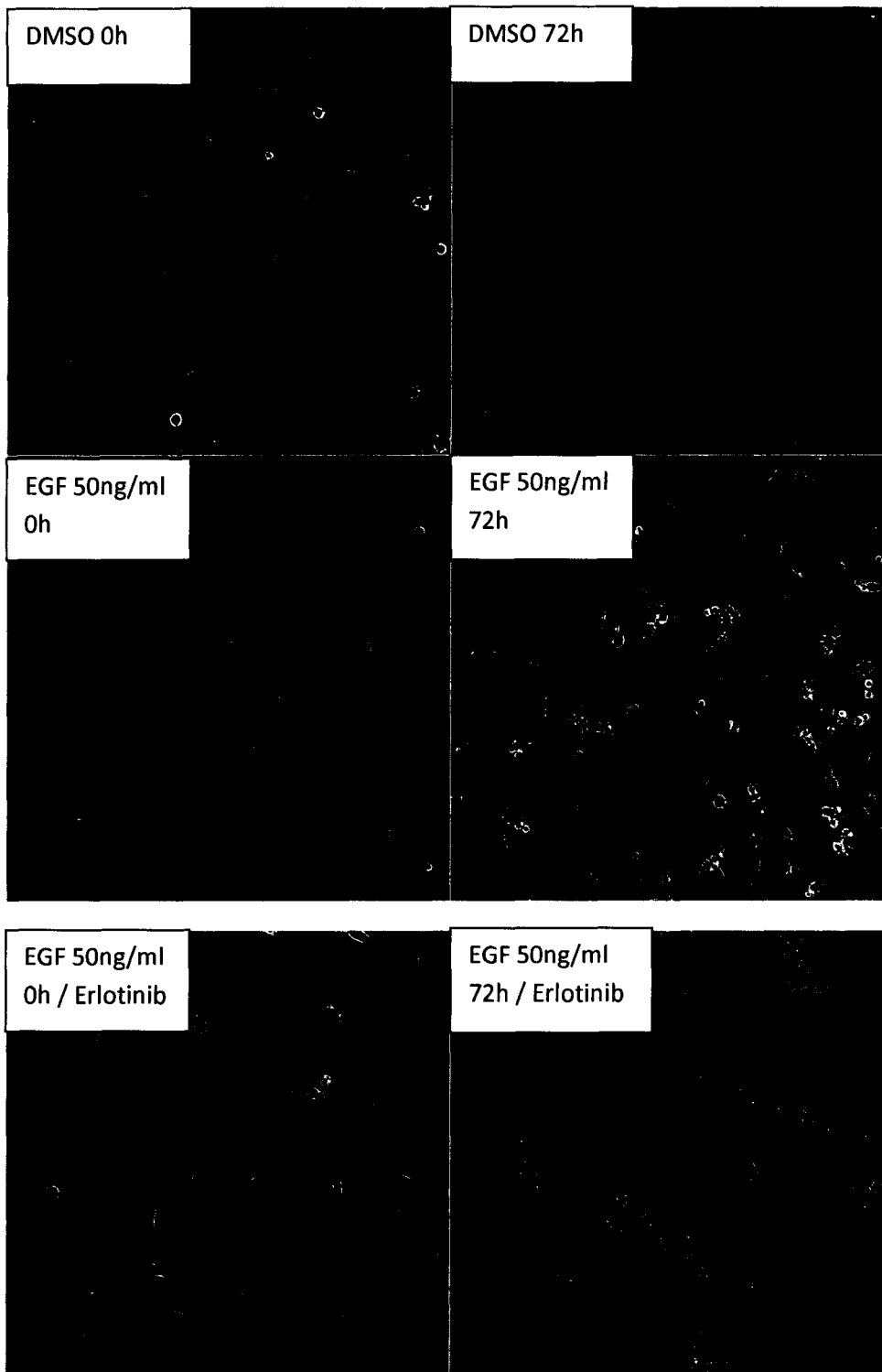
Kolejne dni

5. Co 24 godziny zmieniać pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/Erlotinibu do odpowiednich naczyń powyżej określonych jako A, B i C.
6. Wstawić komórki do CT-Biostation.
7. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych. Oprogramowanie CT-Biostation pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
8. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że CT-Biostation umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Poniżej przedstawiono przykładowe fotografie obrazujące wpływ DMSO, EGF w stężeniu 50 ng/ml, a także kombinacji EGF 50 ng/ml / erlotinib na komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFR bez mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. EGF w stężeniu 50 ng/ml po krótkim czasie wzmocnienia proliferacji powoduje śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFR przy braku mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Erlotinib znosi ten efekt.



27



Ryc. 11. Przykładowe fotografie z eksperymentu wykonanego dla komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt przed dodaniem i 72 h po dodaniu EGF w stężeniu 50 ng/ml oraz kombinacji EGF (50 ng/ml) /Erlotinib.

Podsumowanie

AD. a

Komórki wykazujące niski poziom EGFR i brak mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu EGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niski poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo niewielkie pobudzenie proliferacji w porównaniu z komórkami eksponowanymi na DMSO. Dodanie Erlotinibu wraz z EGF do tych komórek nie wywoływało w opisanych warunkach wyraźnego efektów.

Ad. b.

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu EGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. Następnie po dłuższym czasie – 72 h obserwowano śmierć komórek. Erlotinib znosił ten efekty wywołwane przez EGF. Nie jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem działania czynników wzrostu.

Ad. c

Komórki wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niski poziom EGFR

Po dodaniu EGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niską ekspresję EGFRwt i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR nie obserwowano wyraźnego efektu. Erlotinib nie wykazywał wyraźnego efektu w odniesieniu do tych komórek eksponowanych na EGF w stężeniu 50 ng/ml.

Ad. d

Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Widoczne było zahamowanie proliferacji i śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję EGFRwt i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR, a eksponowanych na EGF w stężeniu 50 ng/ml po 72h ekspozycji. Erlotinib podany wraz z EGF do tej hodowli znosił cytotoksyczne działanie EGF. Komórki wykazujące wysoki poziom EGFR i mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR eksponowane na EGF i erlotinib zachowują się podobnie jak w warunkach kontrolnych to jest po dodaniu DMSO.

Przykład 5. W celu sprawdzenia przeciwnowotworowego efektu agonisty HGFR – HGF wykonano następujący eksperyment:

Badanie agonisty HGFR – HGF

Badano 4 rodzaje komórek w obecności podstawowego agonisty EGFR:

- a. Wykazujące niski poziom HGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- b. Wykazujące wysoki poziom HGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR
- c. Wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niską ekspresję HGFR
- d. Wykazujące wysoki poziom HGFR i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials and the number 29.

Komórki umieszczono w adherentnych naczyniach 6- dołkowych. Aby odtworzyć wynik należy postępować zgodnie z poniższymi zaleceniami. Zalecenia wykonano dla wszystkich 4 linii komórkowych. W celu wykonania eksperymentu dla każdej z 4 linii hodowlanych przygotowano 3 dołki z komórkami (w sumie 12 dołków).

Dzień 1

7. Komórki w konfluencji do 90% przepłukać buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć PBS.
8. Następnie komórki odkleić od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1X) w czasie 1-3 min w 37°C.
9. Komórki przenieść do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawiesić w pożywce DMEM z wysokim stężeniem glukozy z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
10. Zliczyć komórki.
11. Dodać 5×10^4 komórek na dołek adherentnej płytki 6-dołkowej.
12. Uzupełnić w/w pożywką i pozostawić na ok. 12 godzin.

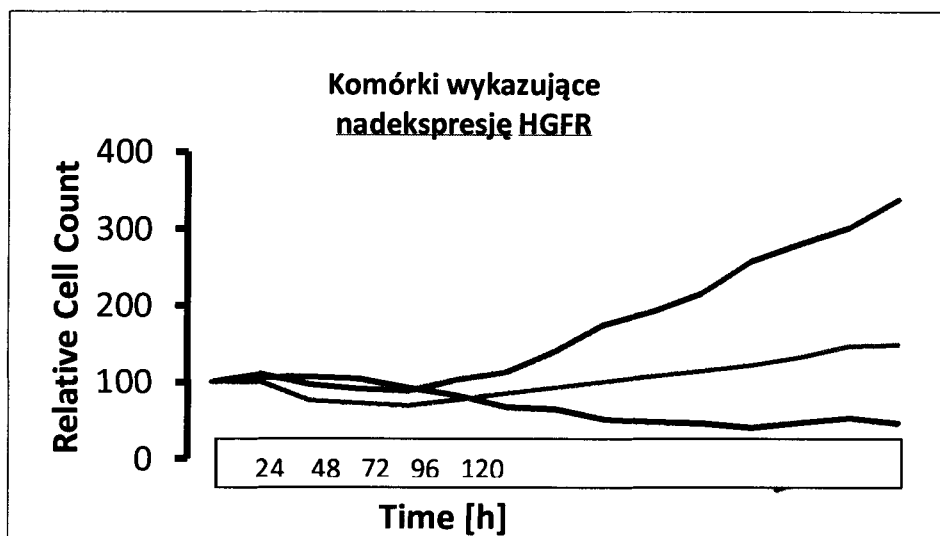
Dzień 2

9. Komórki przemyć 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunąć dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodać 2,5 ml uprzednio przygotowanej pożywki z odpowiednimi związkami (patrz niżej). Przygotować pożywkę DMEM z wysokim stężeniem glukozy z antybiotykami bez surowicy.
Naczynie A – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek: DMSO (1,5 μ l/1 ml) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie B – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek EGF (50 ng/ml), w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
Naczynie C – wszystkie 4 rodzaje komórek – do wszystkich 4 rodzajów komórek HGF (50 ng/ml) i SU11274 (15 μ M) w 5 ml DMEM z wysokim stężeniem glukozy bez surowicy.
11. Wstawić naczynie z komórkami do CT-Biostation. Opisać płytkę i każdy dołek.
12. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 24 godziny zmieniać pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/HGF/ SU11274 do odpowiednich naczyń powyżej określonych jako A, B i C.
14. Wstawić komórki do CT-Biostation.
15. Dokonać automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 3 godzinnych. Oprogramowanie CT-Biostation pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że CT-Biostation umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Poniżej przedstawiono przykładowe fotografie obrazujące wpływ DMSO, HGF w stężeniu 50 ng/ml, a także kombinacji HGF 50 ng/ml / SU11274 na komórki wykazujące wysoką ekspresję EGFR bez mutantu aktywującego heterodimeryzującego EGFR.



Ryc. 12. HGF w stężeniu 50 ng/ml po krótkim czasie wywoływania wzmocnienia proliferacji powoduje zahamowanie proliferacji komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFR przy braku mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR. Po ponad 48 h od dodania EGF uwidacznia się wyraźny efekt cytotoksyczny. SU11274 znosi efekty działania EGF. Linia niebieska – DMSO; linia czerwona – HGF 50 ng/ml; linia zielona – HGF 50 ng/ml / SU11274.

Podsumowanie

Ad. a

Komórki wykazujące niski poziom HGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu HGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niski poziom HGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo niewielkie pobudzenie proliferacji w porównaniu z komórkami eksponowanymi na DMSO. Dodanie SU-11274 wraz z HGF do tych komórek nie wywoływało w opisanych warunkach wyraźnego efektów.

Ad. b

Komórki wykazujące wysoki poziom HGFR i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Po dodaniu HGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFRwt i brak mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR obserwowano przejściowo wzmoczoną proliferację. Następnie po dłuższym czasie (48 h) obserwowano śmierć komórek. SU-11274 znosił efekty wywoływane przez HGF. Nie jest to wynik zgodny z klasycznym rozumieniem działania czynników wzrostu.

Ad. c

Komórki wykazujące wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR i niski poziom HGFR

Po dodaniu HGF w stężeniu 50 ng/ml do hodowli komórek wykazujących niską ekspresję EGFRwt i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR nie obserwowano wyraźnego

[Signature] 31

efektu. SU11274 nie wykazywał wyraźnego efektu w odniesieniu do tych komórek eksponowanych na HGF.

Ad. d

Komórki wykazujące wysoki poziom HGFR i wysoki poziom mutanta aktywującego heterodimeryzującego EGFR

Widoczne było zahamowanie proliferacji i śmierć komórek wykazujących wysoką ekspresję HGFRwt i mutanta aktywującego EGFR, a eksponowanych na HGF w stężeniu 50 ng/ml . SU11274 podany wraz z HGF do tej hodowli znosił cytotoksyczne działanie HGF. Komórki wykazujące wysoki poziom HGFR i mutanta aktywującego EGFR eksponowane na HGF i SU11274 zachowują się podobnie jak w warunkach kontrolnych to jest po dodaniu DMSO.

Andrzej Wyżykowski
Prezes Zarządu

CELTER POLSKA Sp. z o.o.
ul. Ostrzykowitzna 14 a
05-170 Zakroczym
REGON 141564153

