Alternatív sejtelhalási mechanizmusok, mint a daganatellenes terápia célpontjai.

1. A kaszpáz-gátolt leukémia sejtek staurosporin hatására vagy apoptotikussá vagy nekrotikussá alakultak. Egy áramlásos citometriai módszerrel ez a két sejtforma jól elkülöníthető volt egymástól és az ép sejtektől etanol fixált mintákban is. (Imre G, et al. Cystein cathepsin and Hsp90 activities determine the balance between apoptotic and necrotic cell death pathways in caspase-compromised U937 cells. Biochim Biophys Acta 2007; 1773(10):1546-57. IF: 6, 9

Staurosporin (STS) kezelésre a mieloid daganatsejtek többségében az apoptózisra jellemző tipikus morfológiai (citoplazma és sejtmag kondenzáció) és biokémiai változások (DNS fragmentáció, PARP hasítás, foszfolipid asszimetria-, mitokondriális membránpotenciál-, és endo-lizoszómális térfogat-csökkenés) zajlottak le 8 óra elteltével. *Benzyloxycarbonyl*-Val-Ala-Asp-*fluorometylketone* kaszpázgátló (z-VAD.fmk, 50 uM) jelenlétében a DEVD szekvencia mentén hasító kaszpáz aktivitás (kaszpáz 3,7,8) teljesen hiányzott STS indukcióra, de a sejtelhalás nem szűnt meg, csak néhány órával később jelentkezett.

A morfológiai jegyek alapján (elektronmikroszkópos és fénymikroszkópos vizsgálatok) a STS+z-VAD.fmk kezelt sejtek egy része apoptotikussá (DNS és citoplazma kondenzáció) másik része nekrotikussá (vakuolumok, feloldodó sejtszervek és membránok) változott, és nem volt jellemző a kevert típusú morfológiával rendelkező sejtek megjelenése (pl. kondenzált mag, erősen vakuolizált citoplazma).

Kísérleteink közben megfigyeltük, hogy a STS+z-VAD.fmk kezelés hatására kialakuló nekrotikus sejteknek csökken az áramlási citometriával mérhető nagyszögű fényszórás értéke, az SSC intenzitása. A nekrotikus sejtek e tulajdonsága megmaradt etanolban fixált mintákon is. Mivel a fixált mintákon lehetőség nyílik az apoptotikus sejtek detektálására DNS tartalom alapján, így a fényszórás (SSC) és DNS tartalom kétparaméteres diagramon a nekrotikus (SSC csökkenéssel jellemezhető) és az apoptotikus (DNS tartalom csökkenéssel jellemezhető) sejteket el tudtuk különíteni. Kimutattuk, hogy STS+zVAD.fmk kezelés esetében a SSC csökkent intenzitás alapján meghatározott nekrotikus sejtek száma jól korrelál a nem-fixált mintákban a propidium jodiddal (PI) festett nekrotikus sejtek számával. Hidrogén peroxid (2 mM) hatására keletkező nekrotikus sejtek SSC fényszórása is csökken, de kisebb mértékben. A STS indukálta apoptózist *in vitro* követő (másodlagos) nekrózis pedig még kevésbbé csökkentette a sejtek SSC értékét.

Jelentőség: Az általunk kidolgozott áramlásos citometriai módszer, amelyben a SSC paraméter jelzi a nekrózis megjelenését, alkalmas lehet vegyes sejtelhalási formát indukáló szerek jellemzésére. Fontos szempont lehet ezzel kapcsolatban, hogy sejtelhalási „markerek" (mint a SSC csökkenés vagy a DNS degradáció) „korrodeálodnak" posztmortem, ezért ez a technika is kvantitatívan csak relatíve szinkronizált sejtelhalási folyamatok tanulmányozásához alkalmazható.

A módszert részletesebben U937 és HL-60 leukémia sejteken vizsgáltuk illetve kísérleteket végeztünk még RKO colon carcinoma és Jurkat leukémia sejteken is, ahol az SSC csökkenés szintén megfigyelhető volt.

2. A kaszpáz-gátolt, staurosporinnal indukált leukémia sejtekben a z-FA.fmk gátolta az apoptotikus sejtelhalást, a geldanamycin pedig megszüntette a nekrotikus sejtelhalási forma kialakulását. (Imre G et al. Cystein cathepsin and Hsp90 activities determine the balance between apoptotic and necrotic cell death pathways in caspase-compromised U937 cells. Biochim Biophys Acta 2007; 1773(10):1546-57. IF: 6, 9)

A STS+z-VAD.fmk-val kezelt mintákban a kaszpáz aktivitás teljes gátlása mellet mégis jelentkezett az apoptózis két biokémiai markere, a western blottal detektálható 89 kD-os PARP fragmentum és az agaróz-gélelektroforézissel kimutatható DNS létraképződés. Mindkét jelenség kiváltója proteolitikus hatás lehet (a DNS fragmentáció esetében a CAD DNáz felszabadulása az ICAD gátló fehérje hasítása után). A katepszinek szerepét feltételezve vizsgáltuk meg a z-FA.fmk cisztein proteázgátló hatását a sejtelhalásra.

A STS+z-VAD.fmk kezelt mintákban a z-FA.fmk előkezelés jelentősen csökkentette az apoptotikus sejtek számát ugyanakkor szignifikánsan növelte a nekrotikus populációt áramlásos citometriával mérve. A PARP fragmentum és az apoptózis morfológiai megjelenését is gátolta. Az apoptózis gátlása és a katepszinaktivitás gátlása (z-FR.amc, z-RR.amc fluorescens szubsztráttal sejtlizátumban detektálva) jól korrelált egymással jelezvén, hogy az apoptózisgátlás valószínűleg a katepszinaktivitás gátlásán keresztül valósul meg.

A RIP1 proteinkináz a nekrotikus jelpályák egyik csomóponti szabályozó eleme. Mivel RIP1 a Hsp90 chaperon kliensfehérjéje, ezért működése leszabályozható geldanamycinnel (GA), amely a Hsp90 bénításával elősegíti a RIP1-nek a proteaszómán keresztüli lebomlását.

A GA kezelés szignifikánsan csökkentette a nekrózist miközben az apototikus sejtek számát növelte a STS+z-VAD.fmk kezelt mintákban áramlásos citometriával mérve. A GA a nekrózis morfológiai megjelenését is gátolta.

Kimutattuk, hogy a két szer (z-FA.fmk és GA) együttes adása szignifikánsan csökkentette az apoptózist és a nekrózist is. Az apoptózis (annexin V pozitivitás és sub-G1 sejtek) és a nekrózis (PI felvétel, SSC csökkenés) összes áramlási citometriás jellemzőit gátolta a két szer együttes adása STS + z-VAD.fmk kezelés után 8 órával. A kezelés eredményesen megőrizte a sejtek citoplazmatikus és magi struktúráját, valamint a mitokondriumok potencilját és az endo-lizoszómális térfogatot részben, ellenben a sejtek térfogata csökkent a kontrollhoz képest. A térfogatcsökkenés ellenére a kettős kezelés (z-FA.fmk+GA) hosszabb távon védte a sejteket az elhalástól, melyet a morfológiai analízis (18 óra) és az áramlásos citometriás profilok (42 óra) támasztanak alá.

A gátlás specificitására utal, hogy a z-FA.fmk+GA nem volt hatással sem a STS okozta kaszpáz-függő apoptózisra, sem pedig a H_2O_2 (2 mM) indukálta nekrózisra.

Jelentőség: A kapott adatok alapján két alternatív jelpálya séma képzelhető el kaszpázgátolt sejtekben staurosporin hatására. Az egyikben a katepszin vagy annak célmolekulája és a Hsp90 kliensfehérjéje közeli, szoros kapcsolatban egyfajta söntként szabályozza a sejtek elköteleződését az apoptotikus vagy a nekrotikus elhalási jelpálya irányába. A másik elképzelés szerint az apoptotikus és nekrotikus jelút párhuzamosan, egymástól lényegében függetlenül fut le a sejtben. Ebben az esetben az, hogy egy adott sejt aktuálisan melyik sejthalálforma jelenik meg, az dönti el, hogy éppen melyik jelpálya jutott el, hamarabb az elköteleződési szakaszba. A sejtek eljutása az elköteleződési pontba több órát igényelhet, míg az elhalt sejtforma kialakulása csupán percekig (10-30 perc) tart. Ezért az egyik sejtelhalási forma irányába elköteleződött sejtben gyorsan kialakul az egyik forma, és nem jut idő arra, hogy a másik jelpálya jelentősen beleszóljon ebbe. Bár a két modell egymás alternatívái, mindkét esetben a katepszin és a Hsp90 aktivitások együttes gátlása szükséges és elegendő a „kaszpáz-független" sejtelhalás teljes gátlásához.

Vizsgálataink fontos eredménye, hogy az általunk alkalmazott modell rendszerben ki tudtuk mutatni, hogy az egyes sejtelhalási formák farmakológiai módszerekkel átalakíthatók egymásba. A sejtelhalási forma meghatározhatja, hogyan reagálnak rá az immunsejtek. Az apoptotikus forma kialakulását általában nem kíséri gyulladás és gyakran csendesíti az immunreakciót. A nekrotikus formák megjelenése gyulladással jár, amely a makrofág infiltráción és aktiválódáson keresztül fokozza a lokális sejtproliferációt, ugyanakkor a nekrózis elősegíti a dendritikus sejtek érését, az adaptív immunrenszer reakcióját fokozva. Az eredményeinkkel kapcsolatos egyik fontos kérdés, hogy vajon „kikeverhető-e" farmakonok segítségével egy olyan sejtelhalási profil daganatokban, amely a természetes és adaptív immunrendszer minden előnyét kihasználva segít a daganatellenes immunitás kialakításában.

3. A kaszpáz-gátolt leukémia sejtekben a staurosporin-indukálta apoptotikus és nekrotikus sejtelhalási forma kialakulását is megakadályozta a CA-074OMe proteáz gátló, de ezt a hatást nem (csak) a katepszin B aktivitás gátlásán keresztül fejtette ki. (Mihalik R et al. Cathepsin B-independent abrogation of cell death by CA-074-OMe upstream of lysosomal breakdown. Cell Death Differ 2004;11(12):1357-60. IF: 8,2)

A itt következő az eredményeket egy korábbi OTKA támogatás (Mihalik R. OTKA T029611, 1999-2002) segítségével értük el és fontos kiindulópontja volt a most lezárult pályázatunknak. Eredményeinket a pályázat beadása után sikerült publikálnunk.

A STS+z-VAD.fmk kezeléssel indukált sejthalál apoptotikus és nekrotikus formáját a CA074-OMe katepszin inhibitor felfüggesztette (EC_{50}=5-15 μM), kivédve a mitokondrium depolarizációt és

az endolizoszómális térfogat csökkenését. A triton X-100 detergens segítségével nyert lizátumban vizsgálva a katepszin aktivitást fluoreszcenc szubsztrátok felhasználásával (katepsin B, L, H: z-FR.amc; katepszin B: z-RR.amc) azt találtuk, hogy a CA-074OMe már EC_{50}=0,01-0,04 μM koncentráción gátolta a katepszin aktivitást és 0,1 μM-nál már teljesen gátolta a katepszi B-re jellemző RRáz proteáz aktivitást. Ez azt mutatja, hogy 1) az esetleg a citoplazmába kerülő szolubilis katepszin B-re nincs szükség a kaszpázhiányos sejtekben lezajló sejtelhaláshoz és 2) a CA-074OMe gátlószer a sejtelhalásra kifejtett hátását nem a katepszin B közvetíti.

Jelentőség: A CA-074 4-5 nagyságrenddel jobban gátolja a katepszin B-t, mint a katepszin L-et illetve katepszin H-t, ex vivo. Irodalmi adatok szerint a CA-074OMe általában 10-100 μM koncentráció tartományban gátolta a sejtelhalást (nekrózist és apoptózist is) és a katepszin B gátló hatását is csak ebben a koncentrációtartományban vizsgálták legfeljebb. Az általunk kapott új eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy körültekintőbben kell eljárni ennek a gátlószernek az alkalmazásakor. A CA-074OMe katepszin B független célmolekulája fontos komponense lehet a leukémia sejtek kaszpáz aktivitástól független sejtelhalási jelpályájának. A feltételezett célmolekula jelentőségét az is alátámasztja, hogy neuroblasztóma sejtekben bortezomib proteaszóma gátlószerrel indukált kaszpáz aktivitással mediált sejtelhalást gátolni tudtuk CA-074OMe-val kaszpázgáló hiányában is. Hasonlóan a leukémia sejtekhez, a neuroblasztóma sejtekben is sokkal alacsonyabb CA-074OMe koncentrációban már gátlódott a katepszinaktivitás, míg a sejtelhaláshoz több, mint két nagyságrenddel nagyobb koncentráció szükséges. Ezek az eredmények is megerősítették bennünk azt a feltevést, hogy érdemes lenne ezt a feltételezett célmolekulát meghatározni.

A fenti (1-3 pontban felsorolt) eredményeket felhasználva Imre Gergely PhD hallgató 2007-ben benyújtotta doktori értekezését a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskolájába.

4 A mikrotubulusok felépítését gátló nokodazol farmakon által indukált sejtelhalást leukémia sejtekben akadályozták a proteszóma gátlószerei. (Nagy K, et al. Proteasome inhibitors abolish cell death downstream of caspase activation during anti-microtubule drug-induced apoptosis in leukemia cells. Anticancer Res 2005;25(5):3321-6. IF: 1,6)

A proteaszóma számos sejtelhalásban érdekelt fehérje lebontását végzi. Eltérő sejtelhalás indukciók esetén eltérő hatása lehet a proteaszóma aktivitás gátlásának. Ráadásul az aktivitás hiánya a sejtekben stresszválasz alakul ki, amely antagonista hatású lehet. HL-60 mieloid leukémia sejtekben a nokodazol mitotikus blokkot és ebből kinduló apoptotikus sejtelhalást eredményez. A proteaszóma aktivitás gátlása lactacystinnel vagy MG132-vel a mitotikus blokkot követően részlegesen gátolta a leukémia sejtek apoptotikus elhalását. Kimutattuk, hogy a kaszpáz 3 jellegű proteáz aktivitás nem csökkent a proteaszóma gátlószerek hatására, ugyanakkor a DNS fragmentáció mértéke csökkent. Eredményünk azt jelzi, hogy legalábbis a HL-60 sejtekben a proteaszóma aktivitás mediátora lehet a nokodazol-indukálta sejtelhalásnak. Alternatívaként kimutattuk, hogy a proteaszóma gátlás következtében emelkedik az indukálható Hsp 70 stresszfehérje expressziója, ami irodalmi adatok szerint szintén forrása lehet a sejtelhalás gátlásának.
Jelentőség: Eredményeink szerint a leukémia terápiában a proteaszóma gátlás kombinálva a mikrotubulus polimerizáció gátlásával nem feltétlenül vezet szinergikusan fokozodó daganatsejt-elhaláshoz.

5. **A TRAIL citokin indukálta apoptotikus sejtelhalást szinergikusan fokozták a proteszóma gátlószerei vastagbél eredetű daganatsejtekben. (Nagy K. et al. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria.Pathol Oncol Res. 2006;12(3):133-42. Epub 2006 Sep 23.)**

A TRAIL citokin receptorain (DR4, DR5) keresztül pro- és anti-apoptotikus jelpályákat is aktiválhat. A különböző daganattípusokból nyert sejtvonalak eltérő mértékben érzékenyek a TRAIL indukálta sejtelhalásra. A rezisztencia egyik fő okaként az NF-kB szignál indukciója ismert. TRAIL rezistens RKO vastagbél karcinóma sejtvonal esetében a proteaszóma szimultán gátlása szinergikusan fokozta a daganatsejtek TRAIL-indukálta apoptotikus sejtelhalását. A szinergikus hatás elsősorban nem az NF-kB szignál gátlásán keresztül valósult meg az RKO sejtekben. Kimutattuk, hogy a mitokondriálisan lokalizált Smac/Diablo fehérje szelektíven transzlokálodik a citoplazmába, ahol feltételezhetően a kaszpáz proteázok aktivitását gátló IAP fehérjéket köt meg, ezzel felszabadítva a kaszpázokat és a sejtelhaláshoz vezető jelpályát. Nagy Katalin PhD disszertációjában közölt eredmények szerint a Smac/Diablo expresszióját gátló RNS csendesítés (siRNS) részlegesen gátolta a TRAIL citokin és a proteaszóma-gátlószerek által szinergikusan indukált apoptózist.
Jelentőség: A TRAIL citokin daganatellenes terápiás alkalmazása fázis I-ben jár, míg proteaszóma gátló hatású szer, a bortezomib már klinikai alkalmazásban van. Vastagbél dagantok esetében eredményeink szerint a két szer kombinációja hatékonyan javíthatja a daganatsejtek elhalását és így a daganatellenes hatékonyságot.

A fenti (4-5 pontban ismeretetett) eredményeket felhasználva Nagy Katalin PhD hallgató 2006-ben benyújtotta doktori értekezését a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskolájába, amelyet 2007-ben sikeresen megvédett.

6. A sejtelhalás folyamatában a kaszpáz proteázok szerepéről és az alternatív sejtelhalási jelpályák elemeiről egy összefoglaló dolgozatban számoltunk be. (Mihalik R, Imre G. Kaszpázok, apoptózis, sejtelhalás: (jel)útvesztőben. Orvosképzés 2006, LXXXI. évfolyam, 3. szám: 151-157)