

## **A halálreceptor szignálutak működésének változásai a malignus transzformáció során.**

### **Összefoglalás**

Kutató munkánk során a terveknek megfelelően vizsgáltuk a daganatsejtek aktív sejthalálát szabályozó jelátviteli utak működését. Vastagbélrák sejtekben kimutattuk, hogy a TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand) halálligand által kiváltott apoptózis szabályozásában elsősorban az IAP (Inhibitor of Apoptosis) fehérjék, elsősorban a XIAP játszik szerepet. A XIAP gátlása közvetlenül siRNA-vel, vagy a SMAC/DIABLO mitokondriumból történő felszabadulását indukáló hatóanyagokkal illetve SMAC/DIABLO oligopeptidekkel fokozhatja a vastagbélráksejtek TRAIL érzékenységét. A rhabdomyosarkómák esetében kimutattuk, hogy proteasoma gátlók a DR5 halálreceptor expressziójának és aggregációjának növelésével és a Bcl-2 expressziójának gátlásával fokozzák a TRAIL hatékonyságát. Tüdőrákokban kimutattuk, hogy az EGFR (Epidermális Növekedési Faktor Receptor) útvonal aktivációja kapcsolatban van a TRAIL érzékenységgel. Eredményeink szerint az EGFR gátlókra rezisztens tüdődaganatok esetében a TRAIL kezelés hatékony lehet a jövőben. A mellékpajzsmirigy daganatok esetében tanulmányozni tudtuk a malignus transzformációval (hiperplázia, adenoma, karcinóma) összefüggésben létrejövő, az apoptózis szabályozásával kapcsolatos gének expressziós szintjében történő változásokat. A kutatási terv eredeti hipotézisével összhangban azt találtuk, hogy a transzformáció során a pro-apoptotikus gének (pl. TRAIL) expressziója emelkedik, azonban ezt antiapoptotikus (pl. IAP) gének expressziója kompenzálja. Ennek a megfigyelésnek modell értékű gyakorlati jelentősége az, hogy a megfelelő antiapoptotikus jelátviteli mechanizmusok gyógyszeres gátlása közvetett módon daganatspecifikus sejtelhalást idézhet elő. Nemzetközi kollaborációban kimutattuk, hogy a FAS halálreceptor expressziójának szabályozásában szerepe lehet egy specifikus CG hypermetilációjának hólyagrákokban. Ez arra utal, hogy demetiláló hatóanyagok alkalmazhatók lehetnek ennek a daganatfajtának a kezelésében. A kutatási program témájában nyolc nemzetközi és két hazai - a kutatási programmal kapcsolatban lévő és az OTKA támogatását jelző - tudományos közlemény jelent már meg a kutatási időszak alatt, de továbbiak vannak előkészületben. Számos kongresszusi előadásban, poszteren is beszámoltunk az eredményeinkről azonban a jelentésben a már megjelent közleményeken kívül csak a 2007-es absztraktokról számolunk be, hogy jelezzük, az eredmények közzétételének folyamatosságát.

### **A TRAIL halálligand apoptózis indukáló hatásának vizsgálata vastagbélrákokban**

A TRAIL ((TNF-related apoptosis inducing ligand; APO2L), egy olyan úgynevezett halálligand, amely sejt felszíni receptoraihoz (DR4 és DR5 halálreceptorokhoz) kötődve apoptózist képes indukálni arra érzékeny sejtekben. Mivel a preklinikai vizsgálatok szerint a vizsgált daganattípusok több mint fele érzékeny a TRAIL hatására (többek között saját eredményeink szerint is) illetve kevés TRAIL-érzékeny normál sejt típus van, a rekombináns TRAIL illetve anti-DR4 vagy anti-DR5 agonista antitestek (HGS-ETR1) daganatellenes hatását nagy várakozás előzi meg. Az agonista antitestek fázis II. vizsgálatban (2-3. vonalban, monoterápiában) 20-30% körüli terápiás választ (többnyire betegség stabilizálódást) értek el vastagbél és tüdőrákban, gyermekkori szarkómákban pedig most indulnak a klinikai vizsgálatok. A TRAIL illetve TRAIL agonisták klinikai alkalmazásával kapcsolatban tehát két kérdés merül fel: 1. Milyen molekuláris tényezők befolyásolják a TRAIL érzékenységet és azt, hogyan lehet a TRAIL kezelés prediktív diagnosztikájában (teranosztikájában)

felhasználni? 2. Az egyes pont alapján annak megállapítása, hogy milyen molekuláris célpontú gyógyszerekkel lehetne a TRAIL-rezisztens daganatok érzékenységét fokozni.

Vastagbélrákok esetében *in vitro* modellként hat colorectális carcinoma vonalat használtunk amelyek közül háromban a rekombináns TRAIL kezelés hatására apoptózist tudtunk kimutatni sub-G1 áramláscitometriai vizsgálattal.

Irodalmi adatokra támaszkodva, a kiindulási hipotézisünk az volt, hogy a vastagbél-daganatok TRAIL érzékenységét a halálreceptoroktól „dowstream” elhelyezkedő jelátviteli út gátlása szabályozza. Ebben kiemelt szerepe lehet a növekedési faktor receptorok és a TNF-receptorcsalád, így a halálreceptorok által aktivált NIK/RIP/IKK túlélési útvonalnak amely NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor aktivációját, nukleáris transzlokációját hozzák létre. Az NF- $\kappa$ B számos anti-apoptotikus fehérje expresszióját fokozza. Ezek közül is a legfontosabbak az „inhibitor of apoptosis” (IAP) fehérjék, és a Bcl-2. Az NF- $\kappa$ B útvonal gátlása fontos hatásmechanizmusa a proteasoma gátlóknak az I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B) stabilizációján keresztül. A bortezomib/PS341 (Valcade) törzkönyvezett hatásmechanizmusának vizsgálata, prediktív diagnosztikája és a RIP, IKK kináz gátlók fejlesztése a Szentágotthai Tudásközpont keretében végzett kutatási projektem témája, amely a TRAIL érzékenység szabályozásának vizsgálatánál kapcsolódik az OTKA projekthez. Ennek keretében kimutattuk, hogy PS341 hatására a colon carcinóma sejtekben nem változnak az NF $\kappa$ B által szabályozott apoptózis gátló fehérjék (Bcl-2, IAP, XIAP) expresszióinak szintje. Azonban ennek ellenére rendkívüli módon nőtt a sejtek érzékenysége TRAIL-el szemben. Kísérleti eredményeink arra utaltak, hogy az érzékenyítés hátterében a TRAIL/proteasóma gátlószer kombinált kezelés során a mitokondriális proapoptotikus Smac/Diablo fehérje citoplazmába történő szelektív kiáramlása áll. A Smac/Diablo a XIAP antiapoptotikus fehérje gátlásán keresztül fejt ki a hatását. A XIAP gátlásával a kaszpáz-3-t a halálreceptor aktiváció során aktiválódó kaszpáz-8 közvetlenül aktiválhatja. Ezt a hatásmechanizmust sejtfractionálást követő westernblottal, biokémiai esszékkel igazoltuk, számos hazai és nemzetközi konferencián bemutattuk és végül publikáltuk (Nagy K, Petak I. 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.) ezért ezeket a jelentésben nem részletezem. Ez a publikáció volt Nagy Katalin sikeres PhD disszertációjának egy jelentős része 2007-ben.

Az eredmények hasznosítása érdekében a publikáció óta siRNA technológiával is validáltuk a Smac/Diablo-t és az XIAP szerepét a TRAIL érzékenység szabályozásában. A kísérleteinkben azt találtuk, hogy az RKO vastagbélrák vonalban a Smac/Diablo expresszió gátlása csökkentett a sejtek érzékenységét a kombinált TRAIL-proteasoma gátló kezelésre, míg az XIAP expresszió gátlása proteasoma gátlás hiányában is érzékenyítette a sejteket a TRAIL kezelésre. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a XIAP génterápiás célpont lehet vastagbélrákokban TRAIL-el kombinálva. A másik lehetőség, hogy a Smac/DIABLO egy rövid oligopeptid részét mint terápiás szert fejlesszük ki. A gyógyszerkészítés fokozására és a celluláris „uptake” stimulálására Dr. Kéri György professzorral olyan peptidet terveztünk, amiben megvan ez a fontos 7 aminosav és egy olyan rész is, ami sejtmembránon való áthaladást teszi lehetővé. Ennek szintetizálására Dr. Mező Gábort, az MTA peptidkémia munkacsoport vezetőjét kértük meg. Kimutattuk, hogy TRAIL rezisztens vastagbélrák sejtvonalban (RKO), a TRAIL előkezelés után a citoplazmából kivont kaszpáz-3 aktivitás (biokémiai esszében) helyreállítható a „smac peptid” kezeléssel. Ez a kísérlet is igazolja azt a modellt, ahol a TRAIL által aktivált szignál komplex aktiválja a kaszpáz-8 iniciátor kaszpáz-3 szignál út a XIAP gátlása alatt van, amelyet a Smac/DIABLO függeszthet fel. Egy ilyen smac-alapú terápiás megközelítés széles alkalmazási területre tehet szert, hiszen a

halálreceptorok (FAS, TRAIL-R) jelátvitelének a helyreállítása számos, az intrinsic, mitokondriális apoptózis út gátlása (Bcl-2, mutáns BAX) miatt kialakuló kemoterápia rezisztencia leküzdhető lehet. Erről egy részletes áttekintő tanulmányt írtam, mint szerkesztőségi tag a Current Signal Transduction Therapies induló számába (I Petak et al. Molecular Targeting of Cell Death Transduction Pathways in Cancer. Current Signal Transduction Therapy, 2006. 1.1)

Az alapkutatói eredmények terápia fejlesztésén kívül a prediktív diagnosztika fejlesztésében is felhasználhatók. Az *in vitro* modelrendszerünk szerint tehát a TRAIL és a TRAIL/proteasoma gátlók érzékenységét vastagbélrákokban feltehetően az IAP fehérjék, a Bcl-2, a Smac/DIABLO expressziója határozza meg. Ezen kívül kimutattuk, szingenikus p53 vad típusú és p53 null HCT116 vastagbélrák sejtek segítségével, hogy míg a proteasóma gátlók hatásában van p53 függő komponens addig a TRAIL érzékenység p53 független. A HT29 p53 mutáns sejteken bizonyítottuk, hogy a TRAIL és a bortezomib közötti szinregizmus sem függ a p53 statusztól. És ennek hatásmechanizmusa is megfelel a korábbi megfigyeléseinknek, mivel p53 mutáns sejtekben is kimutattuk a kombinált kezelés hatására létrejövő XIAP degradációt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy p53 mutáns colon karcinóma sejt relatív rezisztenciájára lehet számítani proteasoma monoterápiákkal szemben. Azonban a TRAIL és proteasoma gátlók kombinációja a p53 mutáns daganatokban is hatékony lehet.

### **Jelátviteli gének expressziójának fehérje szintű vizsgálata vastagbélrákokban**

A potenciális prediktív diagnosztikai biomarkerek expressziós mintázatának vizsgálata is folyamatban immunhisztokémiai (IHC) módszerrel primer vastagbél daganat mintákból készített szöveti-microarray-ken (TMA).

Ennek során a sejtproliferációt, migrációt és az apoptózist szabályozó jelátviteli utak fehérjéinek (több mint 30 célfehérje) vizsgálatára 55 colorectális rákból 4x6os felépítésben (tissue micro array) TMA-kat készítettünk, amelyeken egy beteg formalinfixált és paraffinba ágyazott archivált metszetmintáiból általában két darab 2mm-es core szerepelt. Ezen kívül a TMA-kból később készítendő metszeteken és immunfestéseken való orientáció és tájékozódást elősegítendő az 1-es pozícióba egy májból készült core került, így az 55 beteg mintája 4 darab 24 core-t tartalmazó TMA-ra fért fel.

Ez a TMA projekt több projekt együttműködésével jött létre Prof. Kopper László iskolateremtő OTKA projektjének vezetésével. Az általam vezetett OTKA projekt az a TRAIL érzékenység apoptózist szabályozó fehérjék vizsgálatával vesz ebben részt.

A TMA metszetek feltárása általában Dako TRS pufferrel történt és az elsődleges antitest bekötődése utáni előhívást is a Dako DAB-os előhívó rendszerével végeztük, így a pozitivitás mértéke a hematoxilinos kék magi háttérfestésen megjelenő barna kromogén jelentette a TMA-k metszetein. Az elkészült immunreakciók metszeteit a 3DHistech cég által kifejlesztett Mirax platformmal digitalizáltuk. Ennek során az üveglemezeket egy nagyfelbontású szkenerrel, a további feldolgozás során adatvesztéséget minimalizáló eljárással elektronikus formátumban tároltuk és a továbbiakban ezen ún. digitális tárgylemezekkel dolgoztunk. Az immunreakciók kiértékelését három patológus egymástól függetlenül végzi és azokban az esetekben ahol az egyedileg megadott értékekben eltérés mutatkozott, az eseteket közösen újranezték és konszenzussal állapították meg az

immunfestés erősségére adandó jellemző számértéket. Az eredményének áttekintése jelenleg is tart.

### Az EGFR jelátviteli útvonal és a TRAIL érzékenység kapcsolata tüdőrákokban

A tüdőrák TRAIL-érzékenységének vizsgálata a vastagbélrák vizsgálatához hasonlóan összekapcsolódott a munkacsoportom olyan kutatási projektjeivel, amelyek a daganatsejtek antiapoptotikus túlélési útvonalait vizsgálják. A OTKA projekt megvalósításával egy időben munkacsoportom részt vett a tüdőrák molekuláris diagnosztikáján alapuló, célzott Epidermális Növekedési Faktor Receptor (EGFR) tyrosin kináz receptor gátlók klinikai alkalmazásának elindításában. Kollégámmal, Dr Schwab Richárddal közösen molekuláris diagnosztika (EGFR gén kópia növekedés és mutáció) alapján prospektíven kezeltünk sikeresen tüdőrákban szenvedő beteget EGFR gátló, gefitinibbel, amellyel négy év daganatmentes túlélést értünk el. Az esetet a *Journal of Clinical Oncology*-ban (11 IF) közzöltük (Schwab R., Petak I. Modern treatment of lung cancer: case 1. Amplification and mutation of the epidermal growth factor receptor in metastatic lung cancer with remission from gefitinib. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7736-8. ). A munkacsoportom új kináz gátlók preklinikai fejlesztésében is részt vesz (Varkondi E... Petak I ..Schwab R. Comparison of ELISA-based tyrosine kinase assays for screening EGFR inhibitors. *J Recept Signal Transduct Res.* 2005;25(1):45-56., Varkondi E.. Petak I Biochemical Assay-based Selectivity Profiling of Clinically Relevant Kinase Inhibitors on Mutant Forms of EGF Receptor *J Recept Signal Transduct Res.* 2008 in press) Ezek a kutatások a halálreceptorok vizsgálatával is kapcsolatba kerültek. Ennek során négy humán tüdőrák sejtvonalat vizsgáltunk: H358-as vonal RAS mutációt és vad típusú EGFR (epidermális növekedési faktor receptor)-t, a H1666 vonal vad típusú RAS és EGFR géneket, de mutáns RAF-ot, a H1650 az EGFR aktiváló mutációját tartalmazza a 19-es exonban, a H1975-ös vonal az EGFR 21-es exon aktiváló mutációját és a EGFR-gátlószer rezisztenciát okozó mutációt (20-as exon) hordoz. Bidirekcionális szekvenálással ellenőriztük az EGFR mutációk jelenlétét. Áramlási citométerrel vizsgáltuk az EGFR expresszióját, amelyet hasonlóan találtunk a négy vonalban. FISH vizsgálattal mind a négy vonalban az EGFR-gént hordozó 17-es kromoszóma triszómiáját állapítottuk meg. Áramlási citometriával vizsgáltuk a sejtvonalak TRAIL-receptor (DR5) sejt felszíni expresszióját. A sejtvonalak TRAIL-érzékenységét, rekombináns TRAIL kezelés (48 óra) után MTT, esszével vizsgáltuk. Az apoptotikus sejtek arányát áramlási citometriával vizsgáltuk, az élő és pusztult sejtek arányának meghatározásához lumineszcens bioassay-t (ATPlite, PerkinElmer) használtunk. Az *in vitro* citotoxicitási vizsgálatokat laboratóriumunkban előállított rekombináns TRAIL fehérjével, és a Vichem Kft. által rendelkezésünkre bocsájtott kismolekula súlyú kinázgátlókkal EGFR gátló erlotinibbel és gefitinibbel végeztük.

Az MTT növekedési esszében megállapítottuk, hogy a legnagyobb TRAIL érzékenységet a RAS-mutáns H358 és a vad típusú H1666 vonalak mutatták, míg az EGFR aktiváló mutációt hordozó két vonal (H1650 és H1975) relatív rezisztenciát mutatott. A H1650-es (EGFR mutáns) sejtekben a Sub-G1 analízis csak 5% apoptózist mutatott ki. Ezzel párhuzamosan a H358 sejtekben a TRAIL koncentráció függő módon 30% apoptózist indukált. Ebből arra következtethetünk, hogy a növekedési gátlásban megmutatkozó különbség hátterében a TRAIL eltérő apoptózis indukációs hatásával függ össze.

Az EGFR gátló erlotinib és a TRAIL között apoptózis esszében szinergizmus tudtunk kimutatni a deléciós mutáns (H1650) sejtekben viszont a H358 sejtekben nem. Ez arra utal, hogy az EGFR az TRAIL érzékenységet gátló jelátviteli mechanizmust aktivál. A Szentágotthai Tudásközpont és a Kopper Professor Iskolateremtő programjának részeként a

vastagbélrákokhoz hasonlóan, ebben a daganattípusban is megvizsgáltuk, hogy az RIP/IKK-Nf-KB útvonalnak szerepe van-e ebben a jelenségben. Ennek során azt találtuk, hogy az IKK kináz gátlása érzékenyíti a tüdőkarcinóma sejteket a TRAIL okozta apoptózisra. Ez arra utal, hogy a tüdőrákokban valóban fontos túlélési mechanizmus az Nf-KB-t aktiváló jelátviteli útvonal. Továbbá az irodalomból ismert, hogy a mutáns RAS az ERK/MAPK kináz útvonal aktiválásán keresztül érzékenyíthet a TRAIL apoptózis indukáló hatására. A bemutatott eredmények az a hipotézist állíthatjuk fel, hogy bár a mutáns EGFR esetében szintén aktiválódik a RAS/MAPK szignálút, azonban ezzel párhuzamosan több apoptózis gátló útvonal is aktiválódik amelyek TRAIL rezisztenciához vezetnek. Ez a model jól magyarázza azt hogy az EGFR gátlása paradox módon nem érzékenyíti úgy a sejteket a TRAIL hatására mint a túlélési szignált hordozó IKK gátlószere.

Az EGFR és a DR5 expressziója nem korrelált a TRAIL érzékenységgel, azonban az EGFR és a RAS mutációk jelenléte igen. Ezeknek az eredményeknek különleges jelentőséget ad, hogy a klinika gyakorlatban most bevezetett EGFR gátló szerek az EGFR mutáns tüdőrákokban hatékonyak, míg a RAS mutáció esetén hatástalanok. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a TRAIL kezelés eredményessége prognosztizálható lehet az EGFR diagnosztikában használt módszerekkel, illetve a TRAIL optimálisan egészítheti ki a tüdőrák terápiáját.

A tüdőrák az egyik legnagyobb számban előforduló daganat típus. Eredményeink alapján az EGFR és a RAS molekuláris diagnosztikájával a TRAIL alapuló terápiák hatásossága prediktálható lehet. Az ehhez hasonló diagnosztikai eljárásoknak hatalmas gazdasági jelentősége lehet. Az általam vezetett munkacsoport publikálta az első átfogó tanulmányt közép-kelet Európában az EGFR gén mutációinak és gén kópiaszám emelkedéséről tüdő adenokarcinómákban

Az EGFR és a RAS mutációinak rutin diagnosztikája lehetőséget ad arra, hogy a jövőben ne csak az EGFR gátló hanem, a TRAIL kezelés személyre szabott alkalmazásáról dönthessünk. (Pinter F ...Petak I. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) High Gene Copy Number and Activating Mutations in Lung Adenocarcinomas Are Not Consistently Accompanied by Positivity for EGFR Protein by Standard Immunohistochemistry. J Mol Diagn. 2008 Feb 8)

### **A rhabdomyosarcomák TRAIL érzékenységeinek molekuláris farmakológiája**

A metasztatikus, tehát szisztémás kemoterápiára szoruló rhabdomyosarcomák 5 éves túlélése a mostani kezelési lehetőségekkel kevesebb, mint 5%. Korábbi kutatásaimban kimutattuk, hogy a rhabdomyosarcoma (RMS) vonalak egy része rendkívül érzékeny a TRAIL apoptózis indukáló hatására. Ennek a preklinikai tanulmánynak szerepe volt abban, hogy az RMS része annak a Fázis I/II klinikai vizsgálatnak amely 2007-ben indult és gyermekkori szarkómák TRAIL kezelésének klinikai hatását vizsgálja az NIH/NCI szervezésében. Ugyanakkor ismert az is, hogy számos RMS vonal rezisztens illetve rezisztenssé válhat a kezelésre. Ezeknek a jelenségeknek a molekuláris mechanizmusa és prediktív diagnosztikája nem ismert. A legfontosabb modell sejtvonalunk, az RD sejtvonal az embrionális rhabdomyosarcomák közé tartozik, mely rezisztens a Fas halálreceptor indukálta apoptózisra, azonban igen érzékeny a TRAIL-re. A TRAIL hatékony kezelés lehet az RMS estek egy részében, de a Bcl-XL és a Bcl-2 apoptózis gátló fehérjék overexpressziója gyakran megfigyelhető ezekben a daganatokban. Kérdés tehát, milyen molekuláris hatásmechanizmusú kezeléssel kiegészítve tudjuk a TRAIL-t az RMS kezelésében felhasználni. A proteaszómagátló-szer bortezomib /

Velcade (PS-341) myeloma kezelésére törzkönyvezett és szolid tumrok esetében fázis II vizsgálatban van. Számos olyan fehérjét ismerünk, melyek a proteaszómák szubsztrátjai és a daganatkeletkezés feltételezett résztvevői. Ezek közé tartozik a tumor szupresszor p53, melyet stabilizál és aktivál a proteaszóma kezelés, szintén stabilizálja az I $\kappa$ B-t és ezáltal csökkenti az NF- $\kappa$ B antiapoptotikus hatását, valamint a proteaszóma szubsztrátjai közé tartoznak sejtfelszíni receptorok (PDGFR, EGFR, FGFR) is. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a bortezomib kezelés fokozza a DR5 TRAIL receptor sejtfelszíni expresszióját. Mivel a daganatsejtek jóval érzékenyebbek a proteaszómagátlókra, mint a normális sejtek, a proteaszóma alkalmas daganat ellenes célpont. Kísérleteink eredménye szerint a Bcl-2 onkogént stabilan overexpresszáló transzfektált RD sejt vonal (RD-Bcl-2) önmagában a TRAIL és a PS-341 kezelésre is csak kismértékben érzékeny, azonban a két szer együttes alkalmazása esetén a PS-341 képes helyre állítani a TRAIL apoptózis okozó hatását. A kombinált kezelés által indukált apoptózis kaszpáz-függő folyamat.

### TRAIL érzékenységet befolyásoló GALNT14 mRNS szint változás Bortezomib kezelés hatására

Irodalmi adatok szerint pankreász carcinóma, nem-kissejtes tüdőcarcinóma és melanoma sejt vonalak esetében a GALNT14 N-acetil galaktózamin transzferáz mRNS szint arányos a sejt vonal TRAIL érzékenységgel és humán tumrok több mint 30 %-ában a GALNT14 túltermelődik (1). GALNT14 RNS interferenciával csökkenthető a TRAIL érzékenység, míg a túltermelés növeli az érzékenységet. Ennek feltételezet oka, hogy a DR4 és DR5 receptorok extracelluláris részén található glikolizációs helyek (szerin, treonin oldalláncok) melyeknek GALNT transzferáz által katalizált O-glikolizációja elősegíti a ligand stimulált DR4 és DR5 receptor aggregációt, majd a receptorokhoz ezután adaptormolekulákon keresztül kötődnek az iniciátor kaszpázok, és beindítják az apoptózis-vérehajtó gépezetet. Korábbi kísérleteinkből tudjuk, hogy az általunk vizsgált rhabdomyosarcoma sejt vonal (RD) TRAIL érzékenysége növelhető bortezomib proteaszómagátló kezeléssel. Vizsgáltuk hogy proteaszóma gátló kezelés hatására hogyan változik a GALNT14 mRNS expresszió sejt vonalunkban.

Kísérleteinkben RD rhabdomyosarcoma sejt vonalat használtunk, ezekben különböző idejű 30 nM-os bortezomib kezelés után vizsgáltuk a GALNT14 mRNS szintet kvantitatív „real-time“ PCR reakció segítségével. Az RNS izoláláshoz RNeasy mini kitet, a real-time PCR reakcióhoz OneStep RT-PCR kitet (Quiagen) és cyber green festéket használtunk. A primereket Primer Express szoftverrel terveztük. A real-time PCR eredmények kiértékelésekor  $\Delta\Delta C_t$  értékeket számoltunk.

Bortezomib kezelés ideje	$\Delta\Delta C_t$	mRNS szint különbség
3 órás kezelés	$\Delta\Delta C_{t_{3h}} = 5,2$	36,7 X növekedés
6 órás kezelés	$\Delta\Delta C_{t_{6h}} = 5,1$	34,2 X növekedés
12 órás kezelés	$\Delta\Delta C_{t_{12h}} = 3,6$	12,1 X növekedés
24 órás kezelés	$\Delta\Delta C_{t_{24h}} = 3,1$	8,5 X növekedés

Az eredményekből látható, hogy rövid idejű bortezomib kezelés (3 és 6 óra) hatására a sejt vonalban több mint 30-szorosra nőtt a GALNT14 mRNS szint a kontroll sejtekhez képest. További vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, a proteaszóma gátló kezelés hatására milyen módon következik be a GALNT14 mRNS szint növekedés és ez okozza-e a fokozott TRAIL érzékenységet.

További kísérleteinkben vizsgálni fogjuk azt is, hogy a protasoma gátlók vastagbélrák és tüdőrák sejtekben is fokozzák-e a GLNT14 expressziót és ez mennyiben járul hozzá a már korábban általunk is megfigyelt és közölt fokozott TRAIL érzékenységhoz.

(1). Wagner KW et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1070-7,

### **A halálreceptor szignálutak változásai a mellékpajzsmirigy daganatos progressziójában**

Az OTKA pályázat alap hipotézise az volt, hogy a daganatos progresszió során - a fokozott proliferációs jelutak, elsősorban a c-MYC onkogén transzkripciós faktor aktivitásának fokozódása révén- fokozódhat a halálreceptor (elsősorban a Fas és a TRAIL rendszer) jelutak aktivitása, ami fontos tumorszupresszor mechanizmus és egyben terápiás célpont lehet. Ezt az eredeti tervek szerint kizárólag vastagbél és tüdőrákokban terveztem vizsgálni. Azonban Szende professzor 2005-ben egy nagyon különlegesen és ritka lehetőségre hívta fel a figyelmemet. A mellékpajzsmirigy műtétek döntő többsége a mellettünk lévő épületben lévő transzplantációs klinikán történik, ahonnan gyors-fagyasztott formában érkezik a műtéti szövet apatológia intézetbe. A két intézet közötti kollaboráció keretében lehetőség volt normál és hyperpláziás elváltozást mutató valamint mellékpajzsmirigy adenoma mintákból intakt mRNS-t kivonni és ebben macroarray technikával több mint 100 apoptózissal kapcsolatos gén expresszióját vizsgálni. Ez egy különleges tumorprogressziós model hiszen a szekunder hatásra kialakuló proliferáció és az autonóm szöveti proliferáció egymás mellett vizsgálható ugyan abban a szövettípusban.

A real-time PCR-el validált eredmények szerint a mellékpajzsmirigy hyperpláziákban és az adenomákban – az eredeti hipotézisnek megfelelően - egyaránt fokozódik a FAS receptor és a TRAIL ligand expressziója. Ezt a pro-apoptotikus irányban történő változást kompenzálhatja az „inhibitor of apoptosis protein”, az IAP1 expresszió fokozódása. Valamint az adenomák esetében az szintén apoptózis gátló APOLLON expresszió fokozódása..

Vizsgáltuk a sejtciklus és a p53 szabályozásával kapcsolatos gének expresszióját is, azt találtuk, hogy a p53 tumorszupresszor fehérjét közvetlenül szabályzó MDM2 gén kifejeződése a korábbi macroarray alapján növekszik, ezt real-time PCR-el egyértelműen nem tudjuk megerősíteni. A sejtciklusban, a DNS károsodás felismerésében és a genom integritásának megőrzésében fontos szerepet játszó ATM expressziója mindkét elváltozásban nagy mértékben csökken. A BCL2 család több tagját is alávetettük a vizsgálatoknak, az eredmények alapján a BCL-X(L) és a BCL-w gének működése fokozódik, míg a BIM-é csökken. A BCL-X(L) bizonyos elváltozásokban képes teljesen gátlani a FAS-indukált apoptózist és részben a kaszpázok aktivációját is, illetve kölcsönhat a p53 fehérje DNS kötő részével, a BCL-w pedig a sejtek túlélését segíti citotoxikus körülmények között, míg a BIM pro-apoptotikus hatású.

A fehérjeszintű vizsgálatokat szöveti microarray technika felhasználásával végeztük, összesen 70 mintában ( 13 normál, 23 hiperpláziás, 22 adenomás, 11 carcinomás, 1 festődési kontroll) tanulmányoztuk az alábbi fehérjék expresszióját: atm, bax, bcl2, caspase8, ciap1, ck8, ck18, ck19, cyclinD1, flip, Ki67, mdm2, p27, p53, survivin, TRAIL. A kiértékelést a metszetek szkennelése után számítógéppel végezzük, ez jelenleg is folyamatban van.

Összefoglalva a génszintű macroarray és PCR vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy az OTKA pályázatban megfogalmazott alaphipotézisnek megfelelően a daganatos transformáció során a apoptózis szabályozásában szereplő gének mintázatában egy átrendeződés figyelhető meg, melyben a proapoptotikus és az antiapoptotikus gének aktivációja egyaránt megfigyelhető, de ezek egyensúlyban vannak. Ezek a molekuláris változások a daganatokban specifikus gyógyszer támadáspontokat hoznak létre, hiszen az antiapoptotikus fehérjék gátlása nagyobb mértékben felboríthatja az egyensúlyt a sejthalál szabályozásában mint a normál szövetekben.

Az eredményeknek daganatbiológiai érdekességükön túl gyakorlati alkalmazása is lehet. Az adenomák és hyperpláziák morfológiai elkülönítése nem mindig könnyű, főleg a kevésbé gyakorlott patológus számára. Itt nyújthat segítséget például az APOLLON immunhisztokémia vizsgálata. Másrészt az eredmények megerősítik azt a hipotézist, hogy az IAP proteinek daganat-specifikus terápiás célpontot nyújtanak.

### **A Fas gén epigenetikus szabályozásának (hypermethylációjának) vizsgálata**

A Fas halálreceptor gén hypermetilációjának (epigenetikus szabályozásának) jelenségét colon karcinómákban egy elsőszerzőséggel megjelent tudományos közlemény írta le először ([Petak I. et al.](#) Hypermethylation of the gene promoter and enhancer region can regulate Fas expression and sensitivity in colon carcinoma. *Cell Death Differ.* 2003 Feb;10(2):211-7.) Kérdés azonban, hogy ez más humán karcinómákban is megfigyelhető-e. Kollaborációban Prof. Kate Williamson-al a belfasti Queen's University Hospital csoportvezetőjével a Fas methylációját vizsgáltuk transitionális sejtes karcinómákban és normál transitionális sejtes hámban. 2004-ben két angol PhD hallgató látogatott meg akikkel a módszereket újra beállítottuk.

Parafinban ágyazott transicionális sejtes karcinómákban a Fas sexpresszióját immunhisztokémiába határoztuk meg. Ehhez pronáz emésztéssel történő antigén feltárást, monoklonális antitestet (Dako) és DAB előhívást alkalmaztunk. Az eredményeink szerint 8 mintából kettőben egyáltalán nem volt kimutatható expresszió míg a további hat esetben rendkívül alacsony de homogén volt Fas a festődése.

Tranzicionális sejtes sejtvonalakból genomiális DNS-t extraháltunk DNase kit (Invitrogen) segítségével majd a bisulfate kezeltük (CpGenome DNA Modification Kit, Chemicon Int, S7820) a nem methylált cytosin bázisok konvertálására. A Fas promoterében (bp -575 and +8) lévő 28 CpG-ből álló DNS szakasz PCR amplifikálásához az általam korábban közölt primerekkel. A PCR termékeket TopoTA cloning vektorba klónoztuk és individuális klónokat szekvenáltunk M13 primerekkel BigDyeTerminátor kit és ABI370 automata szekvenátor segítségével. A Fas első intronjának methylation specific PCR-al történő vizsgálatához szintén bisulfate kezelt genomális DNS-t használtunk amelyet a fent leírt módon készítettünk elő. A PCR kondíciók optimalizálásához a HT1376 sejtvonalból extrahált DNS-t használtunk. Az optimalizált PCR reakció segítségével transicionális sejtes sejtvonalat vizsgáltunk meg.

Izgalmas, közös eredményünk, hogy az általam tervezett metiláció specifikus primerekkel kimutattuk, hogy a primer hólyagrakok egy részében a Fas promoterében egyetlen CG hely hypermetilált. A közleményemben ennek funkcionális jelentőségét kimutattam egy colon carcinóma sejtvonalban *in vitro*. Felmerül, hogy azokban a daganatokban ahol ez CG



hypermetiláció felelős a Fas halálreceptor expressziójának csökkenéséért, ott demetiláló gyógyszerek (mint a klinikai kipróbálás álló Decitabine) helyreállíthatja a Fas expressziót, ami érzékenyítheti a daganatot lokális kemoterápia és esetleg rekombináns FasL számára. A kifejlesztett diagnosztikai eljárás szabadalmaztatását közösen megkezdtük abban a reményben, hogy az alaputatásnak induló projekt esetleg gyakorlati hasznosítást is nyerhet. Ebből közös kutatási együttműködésből eddig egy közös közlemény jelent meg ([O'Kane HF, Watson CJ, Johnston SR, Petak I, Watson RW, Williamson KE](#). Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer. *J Urol.* 2006 Feb;175(2):432-8.) De a szabadalmi kérdések lezárulta után további közös közlemények várhatók.

### **A FAP1 szerepe a Fas indukálta gátlásában**

A FAP-1 (FAS associated phosphatase-1) a FAS receptor intracitoplazmatikus végén lévő 15 aminosavhoz kapcsolódó tirozin-foszfátáz. Ennek a 15 aminosavnak a hiánya növeli a FAS apoptotikus hatását, a FAP-1 transzfektált sejtekben pedig a FAS indukálta apoptózis gátlódik. FAP-1 okozta apoptozisgátlást számos hám eredetű tumorban leírtak.

A Fas klónozása közben felfedeztünk egy a génbanktól eltérő szekvenciát a Fas N-terminális részén lévő 15 aminosavat kódoló szekvenciában, ami a FAP1 megkötéséért felelős (S260F). Ez vagy a daganatban keletkezett mutáció vagy SNP (single nucleotid polymorfizmus) mindkét esetben érdekes lehet mind a daganatok kialakulásánál, a daganatra való hajlamban. Ezért a munkatervünkben szerepelt ennek a mutációnak a vizsgálata primer tüdő és vastagbélrákokban. Vizsgálatainkban 20 darab paraffinba ágyazott mintákból izoláltunk DNS-t. Az izolált DNS-eket nested PCR-rel amplifikáltuk, a reakcióhoz a következő primerek használtuk: Forward1: 5'-TGGCATCAACTTCATGGAAA-3'; Reverse 1: 5'-TGGCTCTTCAGCGCTAATAAAT-3'; Forward 2: 5'-GCCAATCTTTGTACTCTTGCAG-3'; Reverse 2: 5'-TGTACCCAGTAAAAACCAAGCA-3'

Az amplifikált mintákban a mutációt restriktív fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP) vizsgálattal terveztük keresni. A Dde I restriktív enzim ugyanis a mutáns formát hasítaná, a vad típusú mintákat azonban nem. A restriktív enzimmel emésztett minták agaróz gélelektroforézise után azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú minta is megemésztődött, ami arra utal, hogy ez a restriktív enzim nem alkalmas RFLP vizsgálat elvégzéséhez.

Ezek után a PCR minták szekvenálása mellett döntöttünk, így az teljes 15 aminosavat kódoló szekvenciában kereshetünk mutációkat. A szekvenáláshoz a nested primereket használtuk.

A szekvenálás eredményeként azt kaptuk, hogy az általunk vizsgált 20 tumorminta minegyike vad típusú a FAS gén vizsgált szakaszán. A klónozáskor talált mutáció tehát feltehetően nagyon ritka (0-5%) ezért további mintákat már nem szekvenáltunk. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy a FAS intracelluláris doménjében lévő mutációk nem játszanak fontos szerepet a vizsgált daganattípusok FAS érzékenységekben.

### **Kollaborációk a sejthalál molekuláris szabályozásának területén**

Részben kapcsolódott az OTKA témájához Mihalik Rudolf munkacsoportjának az aktív sejthalál kaszpáz független jelútjainak vizsgálata. A kapcsolódási pont az volt, hogy a halálreceptorok szignálkomplexének része a RIP fehérje, amely az Nf-KB jelút aktiváció mellett kaszpáz független, „programozott nekrozis” sejthalálást képes indukálni. A RIP egy instabil fehérje és rendkívül érzékeny a heat-shock protein HSP90 gátlására. A kollaborációban végzett kutatás egyik eredménye az volt, hogy a HSP90 gátló geldenomicin kezelés a nekrotikus sejthalált klasszikus apoptózisra váltotta a modellrendszerben. ([Mihalik R,](#)

[Imre G, Petak I, Szende B, Kopper L.](#) Cathepsin B-independent abrogation of cell death by CA-074-OMe upstream of lysosomal breakdown. *Cell Death Differ.* 2004 Dec;11(12):1357-60. )

A 2005 év végén jelent meg egy tudományos kollaboráció eredményeit bemutató publikáció (Barna G, Sebestyen A, Weischede S, Petak I, Mihalik R, Formelli F, Kopper L. Different ways to induce apoptosis by fenretinide and all-trans-retinoic acid in human B lymphoma cells. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6B):4179-85.). Ez a kutatás projekt Dr. Kopper László munkacsoportjával kollaborációban történt és a retinoidsav agonisták által kiváltott sejthalál jelátviteli mechanizmusait vizsgálta leukémia sejtekben. A munka abban kapcsolódott a jelen OTKA projekthez is, hiszen közreműködéssel vizsgáltuk a halálreceptorok lehetséges szerepét a vizsgált leukémia modell rendszerben. A halálreceptorok iniciátor kaspázának, a caspase-8-nak a gátlása azonban csak kis mértékben csökkentette sejthalált ami a mitokondriális út, pontosabban a EndG kiáramlásának jelentőségére irányította figyelmet.