

# **Proteázok szerepe a sejtelhalás szabályozásában staurosporin kezelt kaszpáz-gátolt leukémia sejteken**

Tézisek

**Imre Gergely**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet



**Témavezető: Dr. Mihalik Rudolf, tudományos főmunkatárs**

Hivatalos bírálók: Dr. Matkó János, tudományos tanácsadó, MTA doktora

Dr. Sóti Csaba, egyetemi adjunktus, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit, egyetemi tanár, MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Herszényi László, egyetemi adjunktus, Ph.D

Dr. Uher Ferenc, tudományos főmunkatárs, Ph.D

Budapest  
2007

---

## 1. BEVEZETÉS

A **katepszinek** az endo-lizoszómális kompartmentbe lokalizált proteázok, amelyek cisztein, szerin és aszpartát aktív centrummal rendelkeznek. Bár általában az egyes katepszinek hiánya nem okoz látványos rendellenességet állatmodellekben, -jelezve átfedő hatásukat-, összehangolt működésük elengedhetetlen a sejtek hosszú távú működéséhez. Jelentős funkciójuk a hosszú életidejű fehérjék, sejszervek lebontása autofágián keresztül. A szekretált lizoszómákból az extracelluláris térbe kerülő katepszinek a szöveti újrarendeződés mediátorai, szerepet játszanak a daganatok inváziójában és a gyulladás kialakulásában is. Egyes alternatív módon szabott RNS-ből keletkezett katepszinfhérjék a mitokondriumba illetve a sejtmagba lokalizálódnak és génkifejeződést szabályoznak.

A fenti funkciókon túl, már régóta feltételezték a katepszinek szerepét a nekrotikus sejtelhalás végső stádiumában, amikor a citoplazmába kerülve, katabolikus, lebontó proteázként működnek. Állatmodellek (*C. elegans*) mutatják a katepszin-homológ proteázok funkcionális szerepét a nekrotikus neurodegenerációban. Bár molekulárisan még nem ismert részleteiben hogyan fejlődik ki az autofágiából az autofágiás sejtelhalás, a katabolikus funkción túl ebben is lehet szerepe a katepszineknek.

Apoptózisban is kimutatták a katepszinek kiszabadulását a lizoszómából a citoplazmába. Az apoptotikus sejtelhalás finoman hangolt, összetett folyamat, amelynek a fő funkciója a nem megújítható sejtek eliminálása a szervezetből optimális adaptív immunválasz kíséretében. A limitált proteolitikus hatás az apoptózis fontos jellemzője. A **kaspázok** a legjobban ismert olyan sejten belüli proteázok, amelyek alakítják az apoptotikus sejtelhalást, és vezérlik a morfológiai és biokémiai jellemzők átrendeződését. A kaspázok aktiválódási körülményei (szignál-komplexek) és proteolitikus célmolekulái (200 feletti számban) is jól ismertek már. Ettől jelentősen elmarad a katepszinek apoptózisban játszott molekuláris szerepének a feltárása. Katepszin-gátlószerekkel és géncsendesítéssel végzett kísérletek alátámasztják, hogy a katepszinek kiegészíthetők, erősíthetők a kaspáz-mediált apoptotikus folyamatokat. Sőt, egyesek arra következtettek kísérleti

---

eredményeikből, hogy a katepszinek az apoptózis lényeges jellemzőinek kialakítása során helyettesíthetik a kaszpázokat. A kaszpázokhoz képest, azonban, egy nagyságrenddel kevesebb citoplazmatikus jelkövetítő katepszin-célfehérje ismert. Bár ezek az ismert katepszin célfehérjék (Bid, PARP, Bcl-2) a kaszpázoknak is célmolekulái, egyelőre nem világos, hogy a sejtelhalási formák kialakulásához elegendő-e ezeknek a molekuláknak a hasítása (aktiválása vagy éppen inaktiválása).

Kísérleteink során egy alkalmas *in vitro* sejtes modellt alakítottunk ki, amelyben kaszpázaktivitás hiányában is lezajlik relatíve szinkronizált módon sejtelhalás. Ebben a modellben szándékoztuk megismerni a cisztein katepszinek és más szabályozó molekulák szerepét a sejtelhalásban.

---

## 2. CÉLKITÚZÉSEK

Előzetes kísérleteinkből világos volt, hogy megakadályozva a kaspázproteázok aktivitását az U937 pre-monocitás leukémia (korábbi meghatározás szerint: hisztiocitás limfóma) sejtekben egy általános kaspázgátló (z-VAD.fmk) alkalmazásával, attól még a leukémiás sejtek kissé késleltetve bár, de elpusztulnak staurosporin vagy TRAIL citokin hatására.. (A staurosporin (STS) egy proteinkináz-inhibitor, amely a kaspáz-mediált apoptózis mitokondriális jelpályájának az aktivátora, míg a TRAIL egy citokin, amely a kaspáz-mediált apoptózis halál-receptor közvetítette jelpályájának az aktivátora). Ebben az u.n. kaspáz-független, alternatív sejtelhalási modellben (U937 sejtek, kaspázgátlás, STS indukció) vizsgáltuk, hogy van-e, keletkezik-e alternatív proteázaktivitás, amely helyettesítheti a kaspázaktivitást ebben a késleltetett sejtelhalásban. A katepszin-gátlószerekkel történt próbálkozásaink közepette kristályosodtak ki az alábbi célkitűzések:

1. Határozzuk meg, hogy a cisztein katepszinek gátlószerei (CA-074OMe és z-FA.fmk) hogyan befolyásolják a sejtelhalási folyamatokat (gátlás vs fokozás). Vizsgáljuk meg, hogy összefüggésbe hozható-e az enzimgátló hatásuk a sejtelhalásra kifejtett hatásukkal!

2. Keressünk olyan változásokat a sejtelhalás során, amelyek segítségével a heterogén sejtelhalási formák (apoptotikus, nekrotikus és vegyes tulajdonságokkal rendelkező formák) megbízhatóan jellemezhetők és elkülöníthetők egymástól áramlásos citometriai módszerekkel!

---

### 3. MÓDSZEREK

#### 3. 1. Sejttenyésztés

U937 és HL-60 mieloid sejt vonalat RPMI 1640 + 10% FBS médiumban tenyésztettük, a kezeléseket 48 lyukú tálcában végeztük. A gátlószerekkel előkezeltük a sejteket: geldanamycin (GA) (1  $\mu$ M, -12 óra); z-FA.fmk (1  $\mu$ M, 30p.); CA-074OMe (40  $\mu$ M, 30p.); z-VAD(OMe).fmk-val (z-VAD.fmk; 50  $\mu$ M, 30p.), majd staurosporinnal (STS; 1  $\mu$ M) indukáltuk a sejt elhalást.

#### 3. 2. A sejthalállal összefüggő funkcionális változások mérése áramlásos citométerrel

Egy áramlásos citometriás mérési profil tartalmazza a mintapreparálást, a mérést, illetve a kiértékelés leírását is.

##### 3. 2. 1. *[PI felvétel] profil: A plazma membrán sérülés detektálása*

A sérült membránnal rendelkező, nekrotikus sejtek, ellentétben az élő sejtekkel, felveszik a membrán impermeabilis PI festéket, mely a DNS-hez kötődve növekedett fluoreszcencia intenzitást mutat.

##### 3. 2. 2. *[Annexin V-FITC, PI] profil: A plazma membránt alkotó foszfatidilszerin eloszlás megváltozásának mérésére*

Az apoptotikus sejtek citoplazmamembránjának külső oldalán is megjelennek a foszfatidilszerin molekulák, amelyet annexin V-FITC jelzéssel detektálhatunk.

##### 3. 2. 3. *[DiOC<sub>6</sub>(3), PI] profil: A mitokondrium transzmembrán-potenciál változásának mérésére*

A mitokondrium belső tere és a citoplazma között jelentős a potenciál különbség. A DiOC<sub>6</sub>(3) festék pozitív töltésének is betudhatóan a mitokondriumban halmozódik fel a potenciáltól függően.

---

**3. 2. 4. [AO vörös] profil: a sejtben lévő savanyú térfogat mennyiségi változásának mérésére**

Acridine orange (AO) egy enyhén bázikus metakróm festék, mely a DNS-hez kötődve zölden fluoreszkál, míg a savanyú endolizoszómális terekben magas koncentrációban összegyűlve vörösen fluoreszkál.

**3. 2. 5. [Sub-G1] profil: Az oligonukleoszómális DNS fragmentáció mérése**

Az apoptózis során a DNS nukleoszómális fragmentációja figyelhető meg. A fragmentált DNS egy extraháló puffer segítségével kivonható az etanolban fixált sejtekből. Ennek következtében az apoptotikus sejtek DNS tartalma alacsonyabb lesz, mint az élő sejteké. A DNS tartalmat DNS kötő, fluoreszcens festék (etidium bromid vagy propidium jodid-PI) hozzáadásával tudjuk mérni, melynek fluoreszcenciája (FL2H) arányos a DNS mennyiséggel.

A mintákat Gong és munkatársai szerint készítettük elő. A sejteket centrifugáltuk, majd az üledéket 70 %-os etanolban (-20 °C) vettük fel. A mintát 30 percig szobahőmérsékleten, majd legalább 1 órát -20 °C-on tartottuk. A sejteket újra centrifugáltuk és az oligonukleoszómális DNS fragmenteket extrakciós puffer (200 mM foszfát, citrát puffer, pH 7.8) hozzáadásával vontuk ki, majd a mintákhoz PI-t (5 µg/ml) adtunk és 15 perc múlva mértük. A sejttörmeléket az [FSC, FL2H] diagrammon kikapuztuk, majd a sejteket az FL2H logaritmikus skálájú diagrammon analizáltuk.

**3. 2. 6. [SSC, DNS tartalom] profil: a fényszórás változás és DNS fragmentáció mérése**

A minta előkészítés fixálási és festési lépései megegyeznek a [Sub-G1] profiléval. A kikapuzott populációt az [SSC, FL2H] diagrammon analizáltuk. Az  $\frac{SSC^{normál}, DNS (FL2H)^{csökken}}{SSC^{csökken}, DNS (FL2H)^{normál}}$  populáció az apoptotikus, az  $\frac{SSC^{csökken}, DNS (FL2H)^{normál}}{SSC^{csökken}, DNS (FL2H)^{csökken}}$  populáció a nekrotikus, míg az  $\frac{SSC^{csökken}, DNS (FL2H)^{csökken}}{SSC^{csökken}, DNS (FL2H)^{csökken}}$  populáció kevert, atípusos sejtelhalási formával rendelkező sejteket foglalja magába.

---

### **3. 3. A hasított PARP fehérje western blot analízise**

Az elektroforézist 10 % poliakrilamid gélen végeztük. Nyúl poliklonális PARP ellenanyagot (Cell Signaling) használtunk és kemilumineszcens előhívást végeztünk.

### **3. 4. Proteázaktivitás mérés**

A mosott sejteket kaszpáz vagy katepszin pufferben lizáltuk 0,2% Triton X-100 detergens jelenlétében és a proteáz aktivitást kaszpáz (z-DEVD.amc) vagy katepszin (z-FR.amc vagy z-RR.amc) szubsztrát segítségével mértük.

### **3. 5. DNS gél elektroforézis**

SDS-ben lizált sejtmintákat proteináz K-val és RNázzal mentesítettünk, és agarózgélben futattuk meg.

### **3. 6. Fénymikroszkópos vizsgálatok**

A citospines mintákat metanolban fixáltuk, hematoxilinnal és eozinnal festettük.

### **3. 7. Elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A sejteket standard módon glutáraldehydben és ozmiumban fixáltuk és műgyantába ágyaztuk.

### **3. 8. Statisztika**

A kísérleteket legalább kétszer megismételtük. Szignifikanciát student féle t próbával határoztuk meg (kétoldalú, párosított).

---

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

### 4. 1. A kaszpázgátolt leukémiás sejtek staurosporin hatására apoptotikussá VAGY nekrotikussá válnak és egy áramlásos citometriai módszerrel ez a két sejtforma jól elkülöníthető egymástól etanol fixált mintákban (is) áramlási citométerrel

**Eredmények:** 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) zajlanak le 8 óra elteltével. *Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone* (z-VAD.fmk, 50  $\mu$ M) jelenlétében a DEVD szekvencia mentén hasító kaszpázaktivitás (kaspáz 3,7,8) teljesen hiányzik, de a STS-kiváltotta sejtelhalás nem szűnik meg, csak néhány órával későbbre tolódik.

A morfológiai jegyek alapján (elektronmikroszkópos és fénymikroszkópos vizsgálatok) a STS+z-VAD.fmk-val kezelt sejtek egy része apoptotikussá (DNS és citoplazma kondenzáció) másik része nekrotikussá (vakuolumok, feloldódó sejtstruktúrák és membránok) változott, és nem volt jellemző a kevert típusú morfológiával rendelkező sejtek megjelenése (pl. kondenzált mag, erősen vakuolizált citoplazma) (**1. ábra A**).

Kísérleteink közben megfigyeltük, hogy a STS+z-VAD.fmk kezelés hatására kialakuló nekrotikus sejteknek csökken az áramlási citometriával mérhető nagyszögű fényszórás (SSC) intenzitása (**1. ábra B**). A nekrotikus sejteknek ez a 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 (**1. ábra C**). Hidrogén peroxid (2 mM) hatására



---

keletkező nekrotikus sejtek SSC fényszórása is csökken, de kisebb mértékben. A STS indukálta apoptózist *in vitro* követő (másodlagos) nekrozis pedig még kevésbé csökkentette a sejtek SSC értékét (**1. ábra D**).

Összefoglalva: az általunk kifejlesztett áramlásos citometriai módszer is megerősítette, hogy a STS+z-VAD.fmk kezelt mintákban jelentkező sejtelhalás két különálló populációra oszlik: elsődlegesen nekrotikusra és (elsődlegesen) apoptotikusra.

**Megbeszélés:** Heterogén sejtelhalási formák kialakulása áramlásos citometriai módszerekkel jól analizálható. Ennek az az előnye, hogy többféle funkció szimultán detektálható, ha megfelelő festési eljárással a „fény-nyelvére” fordítható a sejtben zajló változás. Nekrotikus és apoptotikus sejtek egyidejű kimutatására az eddig alkalmazott áramlásos citometriai módszerek többségének sajátja az, hogy nekrotikus jellemzőként a sérült citoplazmamembrán kimutatását használja. Emiatt a minták 1) nem fixálhatóak, 2) az elsődleges nekrozis nem különíthető el az apoptózist követő ún. másodlagos nekrozistól.

Az általunk kidolgozott módszer alkalmazása a hagyományos nekrotikus membránsérülés mérésén alapuló technikákkal ellentétben nem csak a fixálhatóságot teszi lehetővé, de a segítségével különbséget tehetünk elsődleges és a másodlagos nekrozis között. Az elsődleges nekrotikus sejteknél nem jelentkezik DNS fragmentáció a korai időpontokban, míg a másodlagosan nekrotikus sejteknél igen. Továbbá, az elsődleges nekrotikus sejtek már korán jelentősen veszítenek SSC intenzitás értékükből, míg a másodlagos nekrotikus sejteknél ez csak késleltetve jelentkezik (**1. ábra D**). A különböző citotoxikus hatásokra bekövetkező fényszórás változásokat már korábban is vizsgálták áramlásos citometriával. Azonban a DNS tartalom csökkenés és SSC intenzitás csökkenés egy hisztogrammon való megjelenítése és analízise egy általunk bevezetett új megközelítése az SSC paraméter alkalmazásának.

A nekrotikus sejtek SSC csökkenésének hátterében az lehet, hogy a heterokromatin megszűnik. Azt is észleltük az elektronmikroszkópos képeken, hogy a nekrozis késői fázisában a sejt elveszíti teljes citoplazmáját, mely szintén magyarázhatja a nagy mértékű SSC csökkenést (**1. ábra A**). Az SSC csökkenés nem csupán STS+z-VAD.fmk indukcióra jelentkezik. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val és

---

nigericin ionofórral okozott nekrozisban szintén detektáltunk SSC csökkenést. Az SSC csökkenés azonban nem minden nekrotikus típusú sejtelhalásnál jelentkezik. Például az apoptózisból kialakuló úgynevezett másodlagos nekrotikus sejtek esetén sem, vagy csak késleltetve. Ez is mutatja, hogy a különböző nekrotikus sejtelhalás típusok nem egyformák, és az SSC csökkenéssel történő analízis segíthet a jellemzésükben. A módszert részletesebben U937 és HL-60 leukémia sejteken vizsgáltuk illetve kísérleteket végeztünk még RKO carcinoma és Jurkat, limfoblaszt sejteken is, ahol az SSC csökkenés szintén megfigyelhető volt.

#### **4. 2. A kaszpáz-gátolt leukémia sejtekben a z-FA.fmk gátolja az apoptotikus sejtelhalást, a geldanamycin pedig a nekrotikus sejtelhalási forma kialakulását staurosporin indukciónál**

**Eredmények:** A STS+z-VAD.fmk-val kezelt mintákban a kaszpáz aktivitás teljes gátlása mellett mégis jelentkezett az apoptózis két biokémiai jellemzője, a Western blottal detektálható 89 kD-os PARP fragmentum és az agaróz-gélelektroforézissel kimutatható DNS létra képződés. 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 áramlások 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 sejtlyázumban detektálva) jól korrelált egymással jelezvén, hogy az apoptózis gátlás valószínűleg a katepszinaktivitás gátlásán keresztül valósul meg.

RIP1 kináz a nekrotikus jelpályák egyik csomóponti szabályozó eleme. Mivel RIP1 a Hsp90 dajkafehérje kliense, ezért működése leszabályozható geldanamycinnel (GA), amely a Hsp90 bénításával elősegíti a RIP1-nek a proteaszómával történő lebomlását.

---

A GA kezelés szignifikánsan csökkentette a nekrozist, miközben az apoptotikus sejtek számát növelte a STS+z-VAD.fmk-val kezelt mintákban áramlásos citometriával mérve. A GA a nekrozis morfológiai megjelenését is gátolta.

Kimutattuk, hogy a két szer (z-FA.fmk és GA) együttes adása szignifikánsan csökkentette az apoptózist és nekrozist [sub-G1], [PI felvétel] profilban mérve ( $p < 0,00002$ ). Az apoptózis (annexin V pozitivitás és sub-G1 sejtek) és a nekrozis (PI felvétel, SSC csökkenés) összes áramlásos citometriai jellemzőjét 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 membránpotenciálját és az endo-lizoszómális térfogatot részben. Viszont 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 nekrozisra.

**Megbeszélés:** A cisztein katepszinek egyelőre csak kis számú szubsztrátja ismert a citoplazmában. Ezek közé tartozik a Bid pro-apoptotikus aktiválása, illetve a PARP hasítása, de a kaszpáz-hasítástól eltérő molekulásúlyú fragmentumokat eredményezve. Nincs adat arra, hogy valamelyik katepszin hasítaná az ICAD fehérjét, és ezzel hozzájárulna az apoptotikus CAD DNáz aktiválásához. Bár a katepszinaktivitás gátlása jól korrelál az apoptózis gátlásával z-FA.fmk esetében, ez nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy ez a gátlószer esetleg más célmolekulára (cisztein proteázra) is hat.

A geldanamycin a Hsp90 dajkafehérje ATP kötőhelyét bénítja. Ezen keresztül számos (100-nál több) kliens fehérje marad inaktív konformációban és bomlik le gyorsan az ubikvitin-proteasóma rendszeren keresztül. A kliensfehérjék közül eddig a RIP1-ről ismert csupán, hogy mediátora a nekrotikus sejtelhalásnak.

A kapott adatok alapján két alternatív jelútséma is elképzelhető kaszpázgátolt sejtekben staurosporin hatására. Az egyikben a

---

katapszinek vagy azok célmolekulája és a Hsp90 kliens fehérjéje közeli, szoros kapcsolatban, egyfajta söntként szabályozza a sejtek elköteleződését az apoptotikus vagy a nekrotikus elhalási jelpályára (*elágazásos modell*). A másik elképzelés szerint az apoptotikus és nekrotikus jelút párhuzamosan, egymástól lényegében függetlenül fut le a sejtben (*párhuzamos modell*). 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 pont(ok)ba több órát is igényelhet, míg az elhalt sejtforma kialakulása csupán percekig (10-30 perc) tart. Ezért az egyik sejtelhalási forma irányába elköteleződött sejtben gyorsan kialakulhat az egyik forma és nem jut idő arra, hogy a másik jelpálya jelentősen beleszóljon ebbe. Bár a két modell egymás alternatívái, mindkét esetben a katapszin és a Hsp90 aktivitások együttes gátlása szükséges és elegendő a „kaspáz-független” sejtelhalás teljes gátlásához.

Egyelőre nem világos, hogy más sejtípusok esetében is érvényesül-e ez a szabályozási mód sejtelhaláskor, ha kikapcsoljuk a kaspáz aktivitást. Irodalmi adatok szerint az STS indukálta kaspázmentes sejtelhalás más sejtekben dominánsan vagy nekrotikus vagy apoptotikus. Vajon miből eredhet ez az eltérés? A módszertani problémákat nem szabad elhanyagolni. Az általunk alkalmazott mieloid leukémia sejtvonalak viszonylag gyorsan és homogén módon köteleződnek el a sejtelhalásra 8 óra környékén. Más, pl. limfoid, sejtvonalak esetében ez az elköteleződés jóval lassabb és így inhomogénebb (24-36 óra). Ezért az alkalmazott vizsgálati módszer jelentősen befolyásolhatja, hogy helyesen ítéljük-e meg a sejtelhalás típusát.

---

**4. 3. A kaspáz-gátolt leukémia sejtekben a staurosporin-indukálta apoptotikus és nekrotikus sejtelhalási formák kialakulását is megakadályozza a CA-074OMe proteáz gátló, de ezt a hatást nem (csak) a katepszin B aktivitás gátlásán keresztül fejti ki**

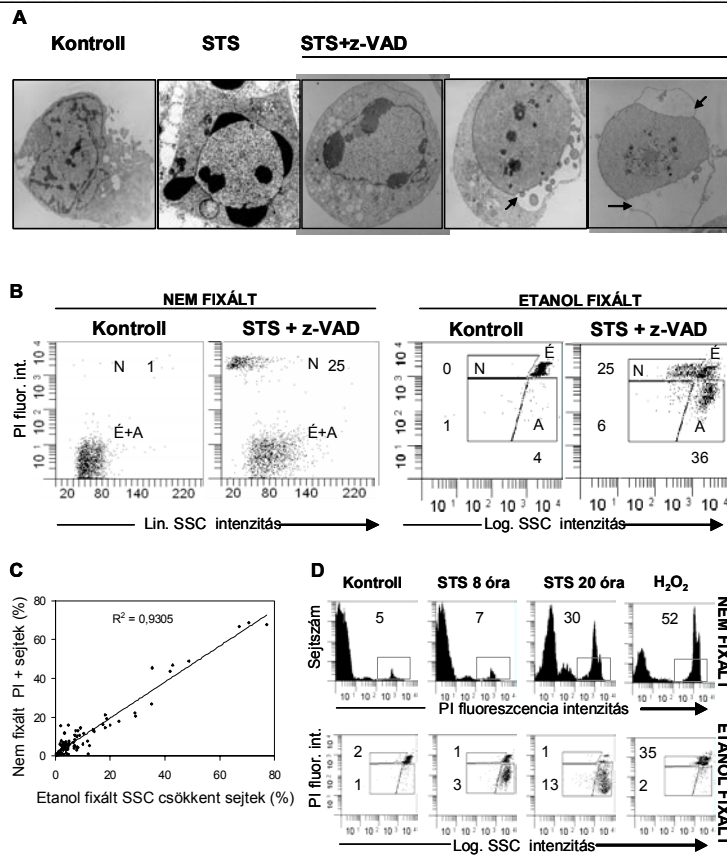
**Eredmények:** A STS+z-VAD.fmk kezeléssel indukált sejthalál apoptotikus és nekrotikus formáját a CA074-OMe katepszininhibitor felfüggesztette ( $EC_{50}=5-15 \mu M$ ), kivédve a mitokondrium depolarizációt és az endo-lizoszómális térfogat csökkenését. A triton X-100 detergens segítségével nyert lizátumban vizsgálva a katepszinaktivitást fluoreszcens szubsztrátok felhasználásával (katepszin B, L, H: z-FR.amc; katepszin B: z-RR.amc) azt találtuk, hogy a CA-074OMe már  $EC_{50}=0,01-0,04 \mu M$  koncentrációnál gátolta a katepszin aktivitást és  $0,1 \mu M$ -nál már teljesen gátolta az RRáz proteáz aktivitást, amelyet specifikusnak tartanak katepszin B-re. Ez azt mutatja, hogy 1) a citoplazmába kerülő tömeges, szolubilis katepszin B-re nincs szükség a kaspáz-hiányos sejtekben lezajló sejtelhaláshoz és 2) a CA-074OMe gátlószer a sejtelhalásra kifejtett hatását nem a katepszin B közvetíti.

**Megbeszélés:** A CA-074 nagyságrendekkel jobban gátolja a katepszin B-t, mint a katepszin L-et illetve katepszin H-t in vitro, excell. A CA-074 viszont kevésbé membránpermeabilis, mivel ionos jellegű. Metil csoportot észter kötéssel kapcsolva hozzá, ún. elővegyületként, már könnyebben bejut a sejtekbe, ahol aspecifikus észterázok alakítják vissza hatékony gátlószerré. Ez a metilezés viszont irodalmi adatok szerint is rontja az elővegyület katepszin B specificitását. Összevetve a z-FA.fmk cisztein proteázgátlószerrrel, amely csak a „kaspáz-független” apoptózist gátolta (a nekrozist fokozta), a CA-074OMe az apoptózist és a nekrozist is gátolta. E két eredményt összekapcsolva azzal, hogy a sejtekből exrahálható katepszin aktivitás gátlásához szükséges inhibitor koncentráció jelentősen alacsonyabb a sejtelhalás gátlásához szükséges inhibitor koncentrációjáénál, jutottunk arra a következtetésre, hogy a CA-074OMe-nak van egy másik, katepszin B-független célmolekulája, amelyhez kapcsolódva a sejtelhalást gátolhatja.

---

Az irodalmi adatok szerint a CA-074OMe általában 10-100  $\mu\text{M}$  koncentráció tartományban gátolta a sejtelhalást (nekrózist és apoptózist is) és ebben a koncentrációban vizsgálták legfeljebb a katepszin B-aktivitást gátló hatását is. Az általunk kapott új eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy körültekintőbben kell eljárni ennek a gátlószernek az alkalmazásakor.

A CA074-OMe katepszin B-független célmolekulája a kaszpázzgátolt sejtelhalásban a mitokondriális és lizoszómális károsodás kialakulás előtti jelpálya szakaszon helyezkedik el, mivel a CA-074OMe gátolta a mitokondrium depolarizációt és a savas sejtalkotók mennyiségi csökkenését is áramlásos citometriával mérve.



1 ábra: **Kaspázinhibitor jelenlétében a staurosporin indukálta apoptotikus és nekrotikus sejtelhalás külön sejtekben manifesztálódik.**

(A) U937 sejteket kezeltünk STS-sel (1 $\mu$ M) kaspá zgátlószer, z-VAD.fmk (50 $\mu$ M) jelenlétében vagy hiányában 8 órát. Az elektronmikroszkópos felvételeken a fekete nyilak jelzik a kettévált magmembránt. A: apoptotikus, N: nekrotikus sejtek. (B) Hasonlóan kezelt sejteket áramlósos citometriával vizsgáltunk. A PI festett NEM FIXÁLT (fixálatlan) mintákat FL2-SSC cytogramon mutatjuk (SSC lineáris skálán). A PI festett ETANOL FIXÁLT (etanolban fixált) sejteket a [SSC, DNS tartalom] profilban mutatjuk (SSC logaritmusos skálán). A számok a megjelölt kapukban lévő sejtek százalékos arányát mutatják. A: apoptotikus, N: nekrotikus, ND: nem elhalt sejtek. (C) A PI+ és SSC<sup>csökkent</sup> sejtek arányainak összehasonlítása párhuzamos mintákból, *különböz* kezelése után. (D) U937 sejteket kezeltünk STS-sel (1 $\mu$ M) 8 vagy 20 órát, vagy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -vel (2,5 mM) 8 órát és a mintákat áramlósos citometriával vizsgáltuk. A PI festett NEM FIXÁLT mintákat a [PI felvétel] profilban mutatjuk. A PI festett ETANOL FIXÁLT mintákat [SSC, DNS tartalom] profilban mutatjuk. A számok a megjelölt kapukban lévő sejtek százalékos arányát mutatják.

---

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kimutattuk morfológiai és áramlásos citometriai módszerekkel, hogy myeloid leukémia sejtekben, ha gátoljuk a kaszpázok aktivitását, késleltetve apoptotikus vagy nekrotikus sejtelhalás zajlik le staurosporin hatására, 8 órás kísérletekben.

Katepszinproteázok gátlószereit (CA-074OMe és z-FA.fmk) alkalmazva kimutattuk, hogy a *nekrotikus* sejtelhalást nem lehet gátolni ezekkel a szerekekkel abban a koncentráció tartományban, ahol a katepszinproteáz már teljesen bénult, azaz a nekrozisnak nem közvetlen mediátorai a cisztein katepszinek. Lehetséges, hogy valamelyik katepszin szerepet játszik a döntési pont szabályozásában, ahol eldől, hogy egy sejt az apoptotikus vagy nekrotikus forma felé köteleződik el (elágazási jelmodell), de végrehajtó funkcióval nem rendelkeznek. Ráadásul nem zárható ki, hogy az apoptotikus és nekrotikus jelpálya párhuzamosan fut le, eltérő sebeséggel a különböző sejtekben és amelyik jel ér el előbb a saját elköteleződési pontjába, az gyorsan beteljesedik (párhuzamos jelmodell). Ez utóbbi esetben még csak szabályozó szerep sem jut a katepszineknek a nekrozisban. Legalábbis az általunk kiváltott nekrotikus sejtelhalási formában. Ez a nekrotikus folyamat feltehetőleg nem kapcsolatos az u.n. autofágiás sejtelhalással, amelyben a lizoszómális katepszinek szerephez juthatnak. A nekrozist gátolni tudtuk necrostatin-1 gátlószerezrel (*nem publikált eredmény*), amely az un. halál-receptor és RIP1 kináz közvetítette nekroptotikus sejtelhalás gátlószere. (nekroptózis: „nekrotikus morfológiájú aktív sejtelhalási forma, amelyet halál-receptor közvetít”).

A katepszinek szerepe a kaszpázgátolt apoptózisban is kérdőjeles. Bár mindkét katepszingátlószer megakadályozta az apoptotikus forma kialakulását, adataink szerint alternatív magyarázatok sem zárhatók ki. A CA074-OMe esetében jelentős koncentráció különbség volt a katepszinaktivitás gátlása és az apoptotikus sejtelhalás gátlása között. Az eredményeink azonban nem zárják ki, hogy egy katepszin B-től eltérő katepszin mediálja a folyamatot. A z-FA.fmk-t alkalmazó kísérleteinkben a katepszinaktivitás gátlása jól korrelált az apoptózis gátlásával. Azonban elképzelhető egy olyan „forgatókönyv” is a fent vázolt párhuzamos jelmodellben, amikor



---

nem az apoptotikus jelpálya gátlódik, hanem esetleg a nekrotikus jelpálya gyorsul fel egy alternatív célmolekula gátlásával! További vizsgálatokat igényel, hogy az általános kaszpázgátlóra kevésbé érzékeny kaszpáz 2 vajon lehet-e mediátora a „kaspáz-független” apoptózisnak illetve célmolekulája-e a z-FA.fmk-nak az általunk alkalmazott koncentráción (ezt részben irodalmi adatok sejtetik).

Összegezve: vizsgálataink fontos eredménye, hogy bár nem tudtuk egyértelműen igazolni, hogy a cisztein katepszinek mediátorai lennének valamely sejtelhalási formának, az általunk alkalmazott modellrendszerben ki tudtuk mutatni, hogy az egyes sejtelhalási formák farmakológiai módszerekkel átalakíthatók egymásba. A sejtelhalási forma meghatározhatja, hogyan reagálnak rá az immunsejtek. Az apoptotikus formák gyakran csendesítik az immunreakciót, nem kíséri gyulladás őket. A nekrotikus formák megjelenése gyulladással jár, amely a makrofág infiltráción és aktiválódáson keresztül fokozza a lokális sejt proliferációt. Ugyanakkor a nekrosis elősegíti a dendritikus sejtek érését, az adaptív immunrendszer reakcióját fokozva. A 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, további kutatásokat igényel és érdemel. Más területen már folynak olyan állatkísérletek, amelyekben pankréaszgyulladásban a sejtelhalást nekrosisból apoptózisba fordítva érik el, hogy csökken az un. másodlagos szöveti károsodás, amellyel elkerülhető a béta-sejtek teljes elvesztése és a diabétesz kialakulása.

Az általunk kidolgozott áramlásos citometriai technika, amelyben a SSC paraméter jelzi a nekrosis megjelenését, alkalmas lehet egyes sejtelhalási formát indukáló szerek jellemzésére. Fontos szempont lehet ezzel kapcsolatban, hogy sejtelhalási „markerek” (mint a SSC csökkenés vagy a DNS degradáció) korrodeálódnak poszt-mortem, ezért ez a technika is kvantitatívan csak relatíve szinkronizált sejtelhalási folyamatok tanulmányozásához alkalmazható.

---

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 6. 1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1. 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;11(12):1357-60. **IF: 8,2**
2. **Imre G**, Dunai Z, Petak I, Mihalik R. 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**

### 6. 2. Egyéb közlemények

3. Nagy K, Petak I, **Imre G**, Barna G, Gezane-Csorba M, Sebestyén A, Houghton JA, Mihalik R, Kopper L. 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**
4. Felföldi B, **Imre G**, Igyarto B, Ivan J, Mihalik R, Lacko E, Olah I, Magyar A. In ovo vitelline duct ligation results in transient changes of bursal microenvironments. *Immunology* 2005; 116(2):267-75. **IF: 3,5**
5. Mihalik R, **Imre G**. Kaszpázok, apoptózis, sejtelhalás: (jel)útvesztőben. *Orvosképzés* 2006, LXXXI. évfolyam, 3. szám: 151-157

### 6. 3. Előadások, poszterek

6. **Imre Gergely**, Dunai Zsuzsanna: TPCCK és TLCK szerinproteáz inhibitorok nem az Omi/Htra2 proteáz inaktiválásán keresztül gátolják a kaszpáz-független elhalást leukémia sejtekben.

- 
- Semmelweis Egyetem Doktori Iskola PhD Tudományos Napok, Budapest 2006. április 13-14. absztrakt szám: E-III/7
7. Z. Dunai, **G. Imre** and R. Mihalik: Staurosporine-induced caspase independent cell death is abrogated by the Omi/Htra2 inhibitor UCF101 by preserving mitochondrial trans-membrane potential. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary 2-7 July 2005, The FEBS Journal, Volume 272 Supplement 1, poster abstract: N5-019P
  8. **Imre Gergely**, Dr. Mihalik Rudolf: Apoptózis-nekrózis reosztát kaszpázgátolt leukémia sejtekben. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola PhD Tudományos Napok, Budapest 2005. április 14-15. absztrakt szám: E-V/1
  9. **G. Imre**, Z. Dunai and R. Mihalik: Abrogation of caspase-independent cell death (CICD) by TPCK or TLCK (unlike to UCF101) is not mediated by Omi/Htra2. 13th Euroconference on Apoptosis, Budapest, Hungary October 1-4, 2005, poster abstract: P-91
  10. **Gergely Imre**, Rudolf Mihalik. To kill two birds with one stone: simultaneous detection of apoptosis and necrosis in ethanol fixed cells by flow cytometry.(2004) XXII International Congress of the International Society for Analytical Cytology (ISAC), LeCorum, Montpellier, France 2004. május 22-27. Cytometry, abstract issue, part A, 59A, number 1, abstract number: 95719
  11. **Imre Gergely**, Dr. Mihalik Rudolf (2004) Programozott sejtelhalás szabályozása kaszpázgátolt leukémia sejtekben: a katepszinek és a Hsp90 szerepe, PhD. Tudományos Napok, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2004. április 8-9., Absztrakt gyűjtemény, 62-63.o.
  12. **Imre Gergely**, Dr. Mihalik Rudolf (2004) Két legyet egy csapásra: az apoptózis és a nekrosis egyidejű detektálása etanol fixált sejteken áramlási citometriával. Modern sejtanalitikai módszerek, IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Semmelweis Egyetem Budapest, 2004. május 6-8. absztrakt katalógus,150.

---

## 7. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Először is köszönöm szüleimnek, Dr. Imre Tamásnak és Dr. Imre Tamásné, Iván Ildikónak a szerető családi légkört, melyet megteremtettek számomra és testvéreim számára. Szeretném megköszönni, hogy mindig mellettem voltak és támogattak.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Mihalik Rudolfnak, aki megmutatta számomra mi az igaz, tiszta kutatás és ennek elengedhetetlen kelléke a kritikus és kreatív gondolkodás. Sokat tanultam tőle szakmailag és emberileg a munkával együtt eltöltött évek során.

Köszönettel tartozom Dr. Kopper László professzor úrnak, hogy lehetőséget nyújtott számomra laboratóriumában és intézetében, hogy egyetemi hallgatóként bekapcsolódhassak az ott folyó kutatómunkába. Köszönöm Dr. Peták Istvánnak, a szakmailag építő beszélgetéseket és a nem csekély anyagi támogatást. Sokat köszönhetek Dr. Nagy Katalinnak, akivel első kísérleteimet végeztem és azóta is rengeteget tanulok tőle. Köszönöm a munkatársként, barátként együtt eltöltött időt. Köszönöm Dr. Barna Gábornak, hogy alapos bírálatával, jó meglátásaival és kérdéseivel segítette a dolgozat tökéletesedését.

Hálával tartozom a Kopper labor összes dolgozójának, akik olyan munkahelyi légkört teremtettek számomra, amiért érdemes volt reggel munkába indulni. Külön köszönettel tartozom, Mallászné Bagi Györgyinek, Csorba Gézáné Maricának és Dr. Berczi Lajosnak a rengeteg emberi támogatásért. Nagy köszönet illeti Dr. Sebestyén Annát, akihez szakmai kérdésekben mindig fordulhattam. Köszönöm Dr. Hajdu Melindának a western blot technikában nyújtott segítséget és a sok baráti beszélgetést. Köszönöm Dunai Zsuzsannának, hogy lelkesedésével, szorgalmával segítette munkámat és, hogy együtt dolgozhattunk.

Nagyon köszönöm Dr. Paku Sándornak és Dr. Szede Béla professzor úrnak, hogy szakértelmével segítette az elektronmikroszkópos képek készítését, értékelését. Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Matolcsy András professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy laborjában elvégezhessem az áramlások citométeres vizsgálatokat. Köszönettel tartozom Dr. Kovalszky Ilonának és a Biokémia labor összes munkatársának, hogy lehetőséget teremtettek számomra a Biokémia labor műszereinek használatára. Hálával tartozom a Molekuláris Terápia labor munkatársainak, hogy befogadtak fiatal, lelkes csapatukba. Külön köszönet illeti Barti-Juhász Helgát, Kánya Melindát, Dr. Pintér Ferencet, Lőrincz Andrást és Jóri Balázst. Hálás vagyok Deák Lindának, Dr. Reiniger Lillának, Bödör Csabának, Dr. Dicházi Csabának, Sándor Szilviának, Dr. Füle Tibornak és Dr. Máthé Miklósnak a jó munkahelyi hangulat megteremtéséért, amitől a munka is jobban ment.

Sok köszönet Laczik Cecilának az értekezéssel kapcsolatos adminisztratív feladatok lebonyolításáért.

Köszönöm az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden dolgozójának, hogy munkatársuk lehettem.