

KATEPSINA B IN X PRI TUMORSKIH MATIČNIH CELICAH

Ana Mitrović ^{1,2}, Damijan Knez ², Izidor Sosič ², Stanislav Gobec ², Janko Kos ^{1,2}

¹ Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Izvleček

Številni bolniki z rakom razvijejo odpornost na terapijo, kar vodi do ponovitve bolezni. Ponovni pojav raka lahko pripišemo predvsem populaciji tumorskih matičnih celic (TMC), ki predstavlja glavni izziv pri razvoju novih terapij za zdravljenje raka. Pri različnih procesih nastanka in napredovanja raka imajta pomembno vlogo lizosomski cisteinski peptidazi katepsina B in X. Njuno aktivnost lahko selektivno reguliramo na več ravneh, vključno z uporabo specifičnih nizko molekularnih zaviralcev, zato predstavljata obetavni molekularni tarči. V tej raziskavi smo pokazali, da sta v TMC povečana izražanje in aktivnost katepsinov B in X ter da lahko z zaviranjem njune aktivnosti vplivamo na fenotip TMC, s čimer bi lahko izboljšali učinkovitost protitumorne terapije.

Uvod

Kljub napredku pri zdravljenju raka v zadnjih letih je ponovni pojav bolezni še vedno glavna težava pri učinkovitem zdravljenju in podaljšanju preživetja bolnikov z rakom. Učinkovitost zdravljenja raka je omejena z razvojem rezistence in s ponovnim pojavom raka (1). Vse več dokazov kaže, da znotraj heterogene populacije celic v tumorjih do pojava odpornosti na terapijo in ponovnega pojava raka pride zaradi prisotnosti majhne populacije tumorskih matičnih celic (TMC), ki so odporne na večino uveljavljene protitumorne terapije (2). TMC so sposobne samoobnovitve, diferenciacije in tvorbe novih heterogenih tumorjev ter so tako ključne za nastanek in vzdrževanje tumorjev ter tvorbo metastaz (2,3). Za premagovanje omejitev obstoječe protitumorne terapije in za podaljšanje obdobja brez ponovitve bolezni zato potrebujemo nove terapevtske pristope, ki bi bili učinkoviti tudi proti TMC.

Primerne tarče za razvoj novih terapevtskih pristopov, ki lahko zavirajo TMC, predstavljajo molekule, izražene v manj diferenciranih tumorskih celicah in TMC, ki jih je mogoče uravnavati s specifičnimi učinkovinami. Kot takšni so bili opredeljeni proteolitični encimi, vključno s skupino lizosomskih cisteinskih peptidaz, katepsinov (4). Cisteinski katepsini sodelujejo v vseh fazah nastanka in napredovanja raka. V rakavih celicah so cisteinski katepsini prekomerno izraženi, premeščeni iz lizosomov in endosomov na celično membrano ali izločeni iz celic. Poleg tega so bili prepoznani tudi kot pomemben del dinamičnega odziva na protitumorno terapijo, bodisi v tumorskih celicah bodisi v celicah tumorskega mikrookolja (5,6). Zaradi prekomerne proteolitične encimske aktivnosti, inhibicija cisteinskih katepsinov predstavlja učinkovito farmakološko orodje za zdravljenje raka, ki lahko zmanjša rast in napredovanje tumorja (4).

Pomembno vlogo pri napredovanju raka med cisteinskimi katepsini lahko pripišemo katepsinoma B in X. Zaradi svoje karboksipeptidazne aktivnosti sta ta dva katepsina edinstvena v skupini cisteinskih katepsinov (7,8). Poleg tega lahko katepsin B deluje tudi kot endopeptidaza, saj je njegova aktivnost opredeljena s položajem zaporne zanke, strukturnim elementom, ki uravnava dostop substratov do aktivnega mesta (7). Nasprotno katepsin X deluje izključno kot karboksimonopeptidaza zaradi vstavka, imenovanega "mini zanka", ki omejuje dostop večjih substratov do njegovega aktivnega mesta (8). Pri napredovanju raka katepsin B direktno razgrajuje proteine zunajceličnega matriksa (ZCM) in kot eden izmed osrednjih delov proteolitičnega omrežja interagira s številnimi drugimi peptidazami (5,6). Glede na nezmožnost katepsina X da direktno razgrajuje ZCM, so bili predlagani različni alternativni mehanizmi udeležnosti katepsina X pri napredovanju raka, vključno s kompenzacijo aktivnosti katepsina B, premostitvijo tumorske senescence, regulacijo integrinskih receptorjev in

regulacijo znanega tumorskega supresorja profilina 1 (8). Povečano izražanje obeh katepsinov B in X je povezano z manj diferenciranimi rakavimi celicami in so ga opazili tudi po kemoterapiji in radioterapiji (9–11).

Katepsina B in X sta bila prepoznana kot obetavni molekularni tarči, primerni za razvoj novih protitumornih terapij. Pokazano je bilo, da zaviranje njune aktivnosti zmanjša rast in invazijo tumorjev tako *in vitro* v funkcijskih testih na celičnih linijah kot tudi *in vivo* na tumorskih mišjih modelih (12–17). V fizioloških pogojih je njuna aktivnost uravnana na več nivojih, vključno z regulacijo z endogenimi zaviralci (7,14,18,19). Vendar ti mehanizmi ne zadostujejo za zmanjšanje škodljivega delovanja pri patoloških pogojih, zato je potrebna uporaba dodatnih eksogenih zaviralcev.

Do danes so bili identificirani številni zaviralci katepsina B. Z uporabo reverzibilnih zaviralcev bi se lahko izognili omejitvam, ki so značilne za ireverzibilne zaviralce in zaviralce s peptidno strukturo, pri katerih številni stranski učinki in nizka biološka uporabnost omejuje uporabo v klinični praksi (7). Takšen reverzibilni zaviralec katepsina B je nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) (12,20). Za razliko od zaviralcev katepsina B je trenutno znanih le nekaj specifičnih zaviralcev katepsina X (8). Kot selektivni reverzibilni zaviralci katepsina X so bile identificirane spojine s triazolno strukturo (13).

Z namenom iskanja novih inovativnih pristopov za premagovanje omejitev, povezanih z odpornostjo tumorjev in preprečevanjem njihovega ponovnega pojava, s katerimi bi lahko izboljšali izide obstoječe protitumorne terapije in povečali njeno učinkovitost tudi proti manj diferenciranim celicam in TMC, smo v tej raziskavi ovrednotili izražanje katepsinov B in X v TMC in preverili vpliv zaviranja katepsinov B in X na fenotip TMC.

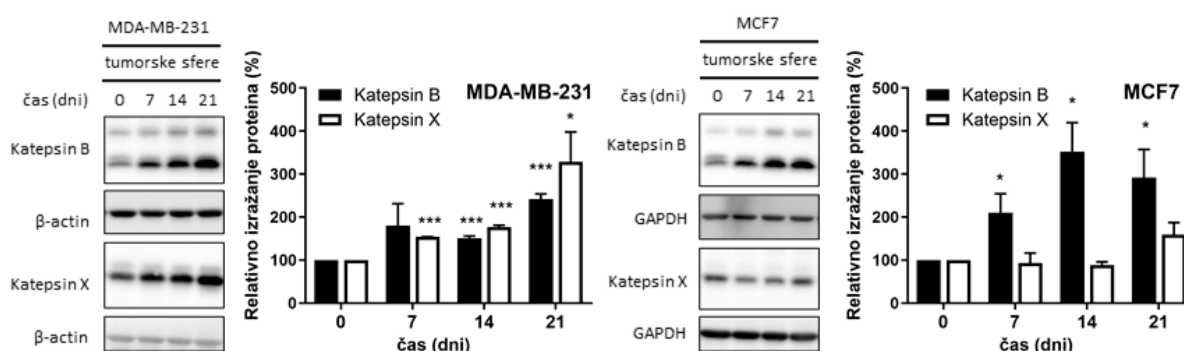
Izolacija tumorskih matičnih celic

Tumorske matične celice se po svojih lastnostih razlikujejo od diferenciranih tumorskih celic, med drugim v izražanju površinskih označevalcev, sposobnosti samoobnavljanja in iniciacije tumorja. Te lastnosti izkoriščamo tudi za njihovo izolacijo. Ena izmed metod, ki jo lahko uporabljamo za izolacijo TMC, je tvorba tumorskih sfer, ki temelji na gojenju celic v suspenziji v gojišču brez seruma. Slednje omogoča proliferacijo in tvorbo tumorskih sfer celicam z lastnostmi TMC, medtem ko onemogoča rast diferenciranih tumorskih celic (21,22). V okviru raziskave smo izolirali TMC na podlagi njihove sposobnosti tvorbe tumorskih sfer iz celičnih linij raka dojke MDA-MB-231 in MCF7, ki se med seboj razlikujeta po stopnji diferenciacije, morfologiji, sposobnosti invazije, metastaziranja in vsebnosti celic s fenotipom TMC (23,24). V ta namen smo celice gojili v suspenziji v gojišču z dodatki, ki spodbujajo diferenciacijo TMC, kot so optimizirani brezserumski dodatek za rast matičnih celic B-27 in rastna faktorja bFGF in EGF. Celice smo za nastanek tumorskih sfer in izolacijo TMC gojili 7, 14 ali 21 dni v inkubatorju pri 37 °C. Čistost izoliranih TMC smo dodatno povečali s pripravo sekundarnih tumorskih sfer, tako da smo nastale tumorske sfere po 7 dneh pobrali, razbili in ponovno gojili 7 dni, da so nastale sekundarne sfere. Nastanek tumorskih sfer smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom.

Uspešnost izolacije celic z lastnostmi TMC s tvorbo tumorskih sfer smo potrdili na podlagi izražanja označevalcev matičnosti in označevalcev mezenhimskega celičnega fenotipa tako na proteinskem nivoju s prenosom western kot na mRNA nivoju z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za gene, katerih izražanje je spremenjeno v TMC. V TMC, izoliranih iz obeh celičnih linij raka dojke, smo s prenosom western pokazali povečano izražanje jedrnega transkripcijskega dejavnika matičnih celic SOX-2, ki je ključen za vzpostavitev in vzdrževanje matičnosti (25) in zmanjšanje izražanja epitelijskega označevalca E-kadherina oz. povečanje izražanja mezenhimskega označevalca vimentina. Povečano izražanje smo pokazali tudi na nivoju mRNA, kjer se je prav tako povečalo izražanje dejavnikov matičnosti, kot so jedrni transkripcijski dejavniki SOX2, OCT4 in NANOG, in označevalcev mezenhimskega celičnega fenotipa kot so vimentin in transkripcijski dejavniki epitelno-mezenhimskega prehoda TWIST, SNAIL1, ZEB1 in ZEB2.

Izražanje Katepsinov B in X se v tumorskih matičnih celicah poveča

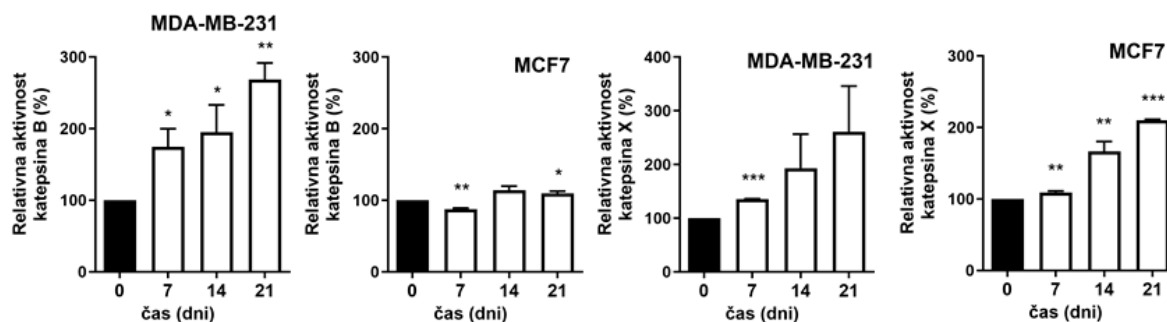
V TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer, smo nato ovrednotili izražanje Katepsinov B in X. Izražanje Katepsinov B in X smo spremljali v celičnih lizatih po ločitvi z elektroforezo z natrijevim dodecilsulfatom in prenosu western ter z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za Katepsina B in X. Izražanje Katepsinov B in X se je v izoliranih TMC povečalo v primerjavi z njunim izražanjem v celičnih linijah pred izolacijo TMC tako pri celicah MDA-MB-231 kot pri celicah MCF7 (Slika 1). Izražanje Katepsina B se je v TMC obeh celičnih linij povečalo za več kot 2-krat pri izolaciji TMC v vseh časovnih točkah tvorbe tumorskih sfer. Prav tako je tudi izražanje Katepsina X v TMC celične linije MDA-MB-231 povečalo za več kot 50%, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 7 dneh, medtem ko se je pri TMC celične linije MCF7 izražanje Katepsina X povečalo šele, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 21 dneh ali ko smo pripravili sekundarne tumorske sfere.



Slika 1. Izražanje Katepsinov B in X v TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7, določeno s prenosom western. Histogrami predstavljajo relativno izražanje Katepsinov B in X v TMC. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov ($n = 2$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

V tumorskih matičnih celicah se poveča aktivnost Katepsinov B in X

Nadalje smo z metodami encimske kinetike ovrednotili aktivnosti Katepsinov B in X v celičnih lizatih TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7. Pri tem smo spremljali razgradnjo specifičnih fluorogenih substratov, za Katepsina B Z-RR-AMC, za Katepsina X pa Abz-FEK(Dnp)-OH. Aktivnost Katepsinov B in X smo primerjali z njihovo aktivnostjo v celicah pred izolacijo TMC (Slika 2). Dobljeni rezultati kažejo, da se je pri TMC celične linije MDA-MB-231 aktivnost obeh Katepsinov B in X povečala že pri njihovi izolaciji iz tumorskih sfer po 7 dneh. Aktivnost obeh Katepsinov se je značilno povečala tudi pri TMC, izoliranih iz celične linije MCF7, vendar se tukaj aktivnost ni povečala, ko smo TMC izolirali iz tumorskih sfer po 7 dneh, ampak šele pri daljši inkubaciji in po pripravi sekundarnih sfer.



Slika 2. Aktivnost Katepsinov B in X v TMC, izoliranih s tvorbo tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7. Rezultati predstavljajo relativno aktivnost Katepsinov B in X v TMC. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ standardna napaka povprečne vrednosti dveh neodvisnih poskusov ($n = 2$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Vpliv zaviralcev Katepsinov B in X na fenotip tumorskih matičnih celic

V zadnjem delu raziskave smo preverili vpliv zaviranja Katepsinov B in X na fenotip TMC. V ta namen smo TMC, izolirane po tvorbi tumorskih sfer iz celičnih linij MDA-MB-231 in MCF7, tretirali s selektivnimi, reverzibilnimi nizko molekularnimi zaviralci Katepsinov B in X (13,20). Kot zaviralec Katepsina B smo uporabili nitroksolin, kot zaviralec Katepsina X pa triazolni derivat spojino Z9 (13,17,20). Določili smo vpliv zaviralcev Katepsinov B in X na fenotip TMC c celičnih lizatih po ločitvi proteinov z elektroforezo in s prenosom western in z metodo RT-qPCR z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. Dobljeni rezultati kažejo, da zaviranje Katepsinov B in X vpliva na fenotip TMC, kar se odraža v zmanjšanem izražanju označevalcev matičnosti, kot so jedrni transkripcijski dejavniki in označevalci mezenhimskega celičnega fenotipa.

Zaključek

Pokazali smo, da sta Katepsina B in X v večjih količinah prisotna v TMC, izoliranih iz celičnih linij raka dojke in predstavljata molekularni tarči, z regulacijo katerih bi lahko izboljšali terapijo, usmerjeno tudi proti TMC. Nadalje naši rezultati kažejo, da regulacija Katepsinov B in X s njihovimi selektivnimi reverzibilnimi zaviralci vpliva na fenotip TMC in da poveča diferenciacijo TMC. Ti rezultati opredeljujejo Katepsina B in X kot primerni tarči za protitumorno terapijo, usmerjeno proti TMC.

Zahvala

Raziskava poteka ob finančni podpori Javne agencije za raziskovalno in inovacijsko dejavnost v okviru raziskovalnega projekta J3-3071 (A.M.) in raziskovalnega programa J4-0127 (J.K.).

Literatura

- Butti R, Gunasekaran VP, Kumar TVS, Banerjee P, Kundu GC. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019;107:38–52.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):714–26.
- Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine (United States)*. 2016;95(1):S8–19.
- Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(9):785–99.
- Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(12):712–29.
- Pečar Fonović U, Kos J, Mitrović A. Compensational role between cathepsins. *Biochimie*. 2024; S0300-9084(24)00085-3
- Kos J, Mitrović A, Mirković B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med Chem*. 2014;6(11):1355–71.
- Kos J, Vižin T, Fonović UP, Pišlar A. Intracellular signaling by cathepsin X: molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:76–83.