

IMUNOSPRESIJA PRI GLIOBLASTOMU: VLOGA CISTATINA F IN VPLIV NA CELICE NK

Emanuela Senjor ^{1,2}, Ana Mitrović ^{1,2}, Marko Jukić ², Matic Proj ², Stanislav Gobec ², Barbara Breznik ³, Janko Kos ^{1,2}, Milica Perišić Nanut ¹

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

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

³ Odsek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

Izvleček

Glioblastom je najagresivnejša oblika možganskih tumorjev, za katero še vedno ni na voljo učinkovite terapije. Značilnosti glioblastoma so heterogenost, dediferenciranost tumorskih celic in invazivnost, ki jih spremlja imunosupresivno mikrookolje. Čeprav je imunoterapija izboljšala prognozo pri mnogih vrstah raka, pri glioblastomu še ni pokazala uspeha. Naravne celice ubijalke (celice NK) igrajo pomembno vlogo v protitumorskem imunskem odzivu, saj lahko inducirajo lizo rakavih celic brez predhodnega stika z antigenom. Ta proces vključuje sproščanje perforina in grancimov, ki povzročijo apoptozo tarčnih celic. Aktivacijo teh citotoksičnih molekul uravnavajo katepsini, aktivnost katepsinov pa endogeni zaviralci cistatini. V celicah NK cistatin F zavira katepsine, pomembne za aktivacijo grancim-perforinske poti in s tem zmanjšuje citotoksičnost celic NK. Pokazali smo, da se cistatin F povišano izraža v glioblastomu, kjer negativno vpliva na preživetje pacientov. Z zaviranjem katepsina V, ki aktivira cistatin F, smo uspeli povečati citotoksični potencial celic NK proti tumorskim celicam. Spojina 7, ki smo jo razvili, selektivno in reverzibilno zavira katepsin V, kar vodi v povečano citotoksičnost celic NK in zmanjšano proliferacijo glioblastomskih celic. Ta strategija predstavlja obetaven pristop za izboljšanje protitumorskega imunskega odziva pri pacientih z glioblastomom..

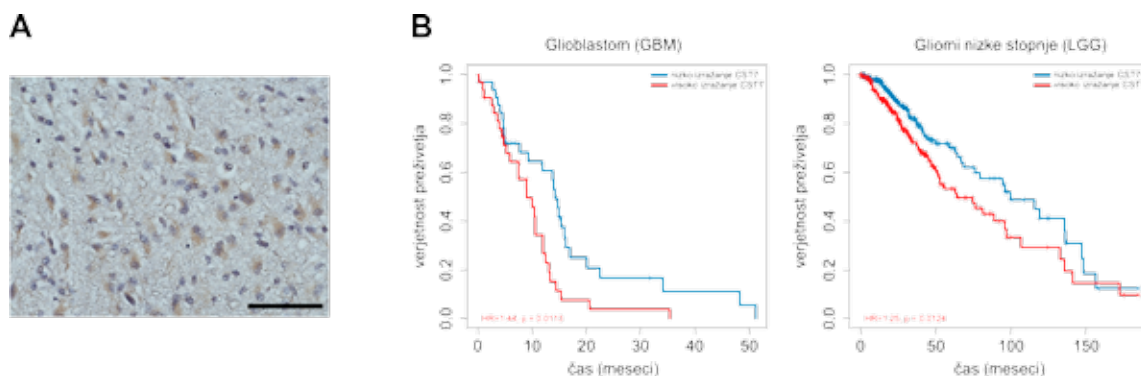
Glioblastom je najbolj agresivna oblika možganskih tumorjev, kjer kljub intenzivnim znanstvenim in kliničnim naporom v zadnjih letih pacienti nimajo obetavnih možnosti terapije. Glavne značilnosti glioblastoma so heterogenost in dediferenciranost tumorskih celic ter invazivnost. Prav tako je v tumorskem mikrookolju glioblastoma prisotnih veliko imunskih celic (celice mikroglije, monociti/makrofagi, ...), ki ustvarjajo imunosupresivno mikrookolje in tako še dodatno podpirajo rast in preživetje tumorskih celic. Preživetje pacientov kljub kirurški intervenciji, radio in kemoterapiji s temozolomidom ni obetavno, povprečno je doba preživetja le 15 mesecev (1). Pri drugih vrstah raka smo lahko v zadnjem času spremljali uspeh imunoterapije, kjer se z različnimi pristopi poskuša aktivirati pacientov lastni imunski odziv. Na tak način se je prognoza marsikateri vrste raka (npr. pri melanomu) bistveno izboljšala. Pri glioblastomu takega uspeha imunoterapija (še) ni uspela doseči (2).

Naravne celice ubijalke (celice NK) predstavljajo 5-20 % limfocitov v periferni krvi. Njihova lastnost je, da lahko sprožijo lizo tarčne celice (bodisi z virusi okužena celica, bodisi maligno spremenjena celica). V primerjavi s citotoksičnimi limfociti T imajo to prednost, da za lizo ne potrebujejo predhodnega stika z antigeni. Aktivira jih že porušeno ravnovesje med aktivirajočimi in zaviralnimi signali po srečanju s tarčno celico. Ena izmed pomembnih poti sprožanja lize tarčnih rakavih celic, ki jo uporabljajo celice NK, je grancim-perforinska pot. Celice NK po aktivaciji v imunsko sinapso sprostijo perforin, ki tvori pore v tarčni, maligno spremenjeni celici, ter grancime, ki vstopijo v tarčno celico preko novo nastalih por, ter sprožijo kaskado aktivacij kaspaz, kar vodi v apoptozo tarčne celice (3). Perforin in grancimi so v celicah NK shranjeni v neaktivni obliki. Za njihovo aktivacijo so pomembni katepsini. Bolj natančno, katepsina C in H aktivirata grancime, katepsin L pa pretvori perforin v njegovo aktivno obliko. Tudi aktivnost katepsinov je regulirana z različnimi dejavniki, kot so regulacija izražanja na genskem nivoju, glikozilacija, pH okolja, ki določa njihovo aktivnost, ter njihovimi endogenimi zaviralci- cistatini. V celicah NK je za regulacijo delovanja katepsinov še posebej pomemben cistatin F (4).

Cistatin F je endogeni zaviralec lizosomskih cisteinskih peptidaz, oz. cisteinskih katepsinov, ki spada v skupino cistatinov tipa II. Cistatin F je vpleten v uravnavanje citotoksičnega delovanja celic NK, saj prepreči aktivacijo perforina in grancimov v citotoksičnih granulah, kjer zavira delovanje katepsinov L in C. Za lokalizacijo cistatina F je ključna N-glikozilacija, saj se lahko nahaja znotrajcelično ali pa se izloča v medcelični prostor. Glikozilacija omogoča lokalizacijo cistatina F v endosomih in lizosomih, prav tako pa tudi privzem dimerne oblike cistatina F, ki se izloča iz celic, v sosednje celice. To omogoča, da cistatin F zavira delovanje katepsinov tudi v tistih celicah, ki ga ne izražajo, kar imenujemo tudi delovanje in trans (5,6).

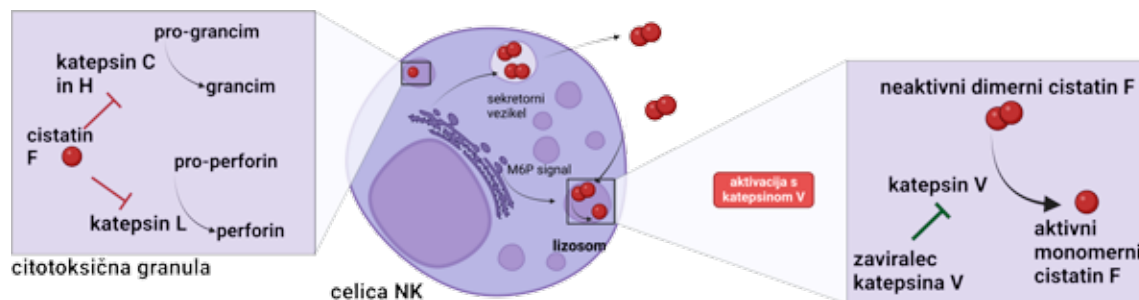
Cistatin F se v fizioloških pogojih nahaja v imunskih celicah (celice NK, citotoksični limfociti T, granulociti, dendritične celice...). Tako kot je značilno za druge cistatine, je njegovo izražanje pri raku deregulirano. Pri številnih vrstah raka se namreč cistatin F povišano izraža v tumorskem tkivu v primerjavi z normalnim tkivom (7,8).

Z uporabo imunohistokemije smo analizirali izražanje cistatina F pri glioblastomu (Slika 1). Ugotovili smo, da se ta ne izraža v normalnem (oz. nerakavem) možganskem tkivu, se pa povišano izraža v tkivnih rezinah pacientov z glioblastomom. Ugotovili smo tudi, da se cistatin F ne izraža le v imunskih celicah (mikrogliji) temveč tudi v tumorskih celicah, ki izražajo označevalce GFAP, SOX2 in CD44. Povišano izražanje cistatina F tudi negativno vpliva na preživetje pacientov z glioblastomom (9).



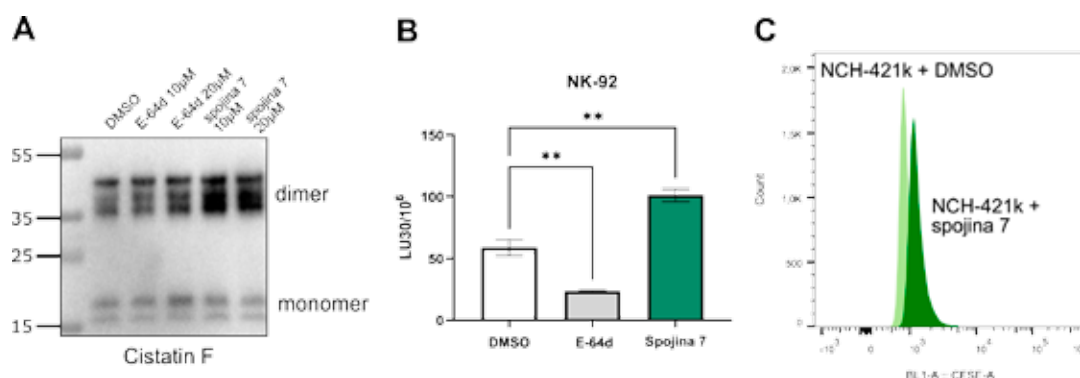
Slika 1. A: Imunohistokemijsko označevanje tkivne rezine glioblastoma za izražanje cistatina F (rjavo). Merilo predstavlja 50 μm. B: Krivulje preživetja pacientov z glioblastomom in gliomi nižje stopnje. Povišano izražanje cistatina F predstavlja slabšo prognozo za paciente. Podatki pridobljeni iz TCGA datাবে podatkov.

Povišano izražanje cistatina F ima negativni vpliv na delovanje protitumornega imunskega odziva. Če celice NK izpostavimo rekombinantnemu cistatinu F, se aktivnost katepsina C zmanjša, kar posledično vodi v zmanjšano aktivacijo grancimov ter nižji citotoksični potencial (5). Cistatin F smo tako opredelili kot enega izmed mediatorjev imunske supresije v tumorskem mikrookolju. Cistatin F ima pomembno lastnost, da katepsine zavira v njegovi monomerni obliki. Za njegovo delovanje je tako potrebna aktivacija iz dimerne v monomerno obliko, kar katalizira katepsin V (10). Izražanje katepsina V je tako kot izražanje številnih drugih katepsinov pri raku povišano. Poleg njegove vpletenosti v aktivacijo cistatina F je bilo pokazano, da ima katepsin V pomembno vlogo pri proliferaciji tumorskih celic, ter preurejanju tumorskega matriksa preko njegove elastazne aktivnosti (11). S ciljanjem aktivnosti katepsina V bi tako lahko preprečili aktivacijo cistatina F in njegove negativne učinke na delovanje celic NK (Slika 2).



Slika 2. Shematični prikaz delovanja cistatina F. Cistatin F v citotoksičnih granulah zavira delovanje katepsinov C, H in L ter tako prepreči aktivacijo perforin-grancimske poti ubijanja tarčnih celic. V tumorskem mikrookolju potrebujemo čim bolj aktivirane imunske celice. Če preprečimo aktivacijo cistatina F v monomerno obliko z zaviranjem delovanja katepsina V, lahko povečamo citotoksični potencial celic NK.

Za ta namen smo razvili nizkomolekularni zaviralec (spojina 7), ki selektivno in reverzibilno zavira katepsin V. Spojina 7 učinkovito zavira pretvorbo cistatina F iz monomerne v dimerno obliko. Na celični liniji celic NK smo pokazali da tretiranje celične linije NK-92 s spojino 7 poveča njihov citotoksični potencial proti tumorski celični liniji K-562 (12). Preliminarni rezultati kažejo, da spojina 7 tudi učinkovito zavira proliferacijo tumorskih celic, tako pri celicah, gojenih v dvodimenzionalnih pogojih, kot pri sferoidih, pripravljenih iz glioblastomskih celičnih linij (Slika 3).



Slika 3. A: Spojina 7 učinkovito zavira pretvorbo dimernega cistatina F v monomerno obliko v celični liniji U-937, medtem ko neselektivni zaviralec vseh katepsinov E64-d nima takega učinka. B: Celice NK-92, ki smo jih tretirali s spojino 7 (20 μM, 18h) imajo višji citotoksični efekt proti celični liniji K-562. C: Glioblastomske celice tretirane s spojino 7 (20 μM, 48h) proliferirajo manj kot kontrolne celice, ki smo jih tretirali s DMSO v testu proliferacije z uporabo pretočne citometrije in barvila CFSE.

Ciljanje katepsina V tako predstavlja obetavno strategijo za zmanjšanje škodljivih učinkov cistatina F na delovanje NK celic ter izboljšanje njihove citotoksičnosti proti rakavim celicam. Predtretiranje celic NK z zaviralcem katepsina V bi tako lahko povečalo odpornost celic NK na imunosupresivne dejavnike v tumorskem mikrookolju, ter omogočilo učinkovitejše ubijanje tarčnih tumorskih celic.

Zahvala

Raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P4-0127 in raziskovalnih projektov Z3-50102, J3-2516, J4-1776, ki jih financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko