

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



**SHRNUTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**KOMBINACE ELLIPTICINU A TERAPIE CÍLENÉ NA  
INTEGRIN  $\alpha 5\beta 1$  PRO LÉČBU GLIOBLASTOMŮ**

**MARTÍNKOVÁ Eva**

Školitelé: Prof. RNDr. Marie STIBOROVÁ, DrSc.  
Dr. Monique DONTENWILL

## Obsah

<b>ÚVOD</b> .....	<b>3</b>
<b>CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>5</b>
<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>5</b>
ČÁST A.....	5
ČÁST B.....	6
<b>DISKUZE</b> .....	<b>7</b>
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	<b>9</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>13</b>
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>15</b>
PUBLIKOVANÉ RUKOPISY.....	15
PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH.....	15
POSTERY .....	15

## Úvod

Gliomy jsou nejhojnějšími nádory mozku, které jsou v současné době léčeny konvenčně chirurgickou resekci, radioterapií, chemoterapií a jejich kombinacemi. Astrocytomy třídy IV ("glioblastoma multiforme" neboli GBM) tvoří zhruba polovinu všech nádorů pocházejících z astrocytů s mediánem přežití kratším než jeden rok, a to bez ohledu na zvolenou léčbu.

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole), alkaloid izolovaný z rostlin *Apocyanaceae*, vykazuje značné protinádorové účinky. Při "screeningu" nádorového panelu NCI byl označen za látku specifickou proti nádorům mozku (Shi et al., 1998).

Farmakologické a/nebo nežádoucí genotoxické účinky ellipticinu jsou závislé na jeho biotransformaci cytochromy P450 (CYP) a peroxidázami, kdy mohou vznikat jak detoxifikační metabolity, tak reaktivní intermediáty, které tvoří kovalentní adukty s DNA (Stiborová et al., 2001, Stiborová et al., 2007a). Ellipticin může také působit jako inhibitor nebo induktor biotransformačních enzymů, čímž ovlivňuje svůj vlastní metabolismus, a tedy i své účinky (Aimova et al., 2007).

Zjistili jsme, že ellipticin je metabolicky aktivován CYP nebo peroxidázami a tvoří kovalentní adukty s DNA *in vivo* v různých tkáních potkana včetně mozku (Stiborová et al. 2001, Stiborová et al., 2003. Stiborová et al. 2004, Stiborová et al. 2007a, Stiborová et al. 2007b). Dutheil a kol. zjistili, že v lidském mozku je exprimováno čtyřadvacet cytochromů P450 (CYP1, CYP2 a CYP3 rodiny a CYP46A1) (Dutheil et al., 2009). Z CYP metabolizujících ellipticin je na úrovni mRNA exprimován CYP1B1 a 1A1 (Dutheil et al., 2009).

Vzhledem k tomu, že prognózy pacientů s diagnózou glioblastomu jsou i nadále velmi neuspokojivé, a to bez ohledu na zvolenou klasickou léčbu, je vysoce aktuální hledat stále nové terapeutické přístupy. Nedávno byly identifikovány integriny jako potenciální terapeutické cíle, a to vzhledem k tomu, že se účastní v různých fázích nádorových procesů. Jedná se o vlastní maligní transformaci, růst nádoru a jeho progresi, invazi a metastazování a dále i angiogenezi. Zvláštní důraz byl kladen na  $\alpha\beta3/\beta5$  integriny, které jsou exprimovány ve zvýšené míře v nových cévách

vyživujících nádor. Jeden z antagonistů integrinu  $\alpha\beta3/\beta5$ , cilengitide, je v současné době klinicky testován pro anti-angiogenetickou léčbu maligních gliomů (Nabors et al. 2007, Reardon et al., 2008).

$\alpha5\beta1$  integrin byl identifikován teprve nedávno jako potenciální terapeutický cíl, protože je hojně exprimován jak v nádorových cévách (Magnussen et al. 2005, Wingerter Parsons et al., 2005), tak v nádorových buňkách. Jeví se tak jako zajímavý terapeutický cíl pro nádory mozku (Kita et al., 2001, Maglott et al. 2006, Martin et al., 2009), plic (Adachi et al., 2000) a nádory vaječníků (Sawada et al., 2008). Exprese  $\alpha5\beta1$  integrinu se liší v různých fázích růstu gliomů (Kita et al., 2001) a ukazuje se být důležitou křižovatkou v signálních drahách nádorových buněk (Bredel et al., 2005). Vzhledem ke vzrůstajícímu zájmu o  $\alpha5\beta1$  integrin vzrostl také počet jeho navržených specifických nepeptidových ligandů (Heckmann et al. 2008, Heckmann et al. 2007, Marinelli et al., 2005). Takoví antagonisté integrinu  $\alpha5\beta1$  dokáží např. blokovat angiogenezi a lymfangiogenezi. (Kim et al., 2000, Okazaki et al., 2009, Umeda et al., 2006).

Se zaměřením na nádory mozku jsme nedávno prokázali, že specifická perturbace funkce integrinu  $\alpha5\beta1$  jeho specifickým antagonistou, SJ749, vede k bloku buněčného cyklu (Maglott et al., 2006) a snižuje agresivitu nádorových buněk (Martin et al., 2009). Navíc jsme ukázali, že exprese  $\alpha5\beta1$  integrinu v gliomech je ovlivněna caveolinem-1, který funguje jako jeho represor. Naše výsledky dokázaly, že buňky exprimující malá množství caveolinu-1 a velká množství integrinu  $\alpha5\beta1$  jsou citlivější k anti-proliferačním a anti-invazivním účinkům SJ749 (Martin et al., 2009). Pomocí 3D modelu integrinu  $\alpha5\beta1$  byly navrženy jeho další selektivní ligandy (Marinelli et al., 2005). Mezi nimi se K34c jeví jako vysoce aktivní ligand s dobrou selektivitou pro integrin  $\alpha5\beta1$  oproti integrinu  $\alpha\beta3$  (Heckmann et al., 2007).

Pokusy o zlepšení účinnosti cílené molekulární léčby zahrnují její použití v kombinaci s radio/chemoterapií. Publikované práce připisují roli v chemorezistenci některých nádorů (včetně gliomů)  $\beta1$  integrinu (Cordes a Park, 2007, Park et al. 2008). Nicméně vzhledem k tomu, že  $\beta1$  podjednotka může dimerizovat s několika různými  $\alpha$  podjednotkami, může se chemorezistence účastnit větší počet různých heterodimerů

obsahujících podjednotku  $\beta 1$  integrin. Úloha podjednotky integrinu  $\alpha 5$  v odpovědi glioblastomů na chemoterapii však dosud nebyla popsána.

## Cíle dizertační práce

Hlavním cílem první části dizertační práce bylo:

- popsat cytotoxicitu ellipticin v modelových glioblastomových buněčných liniích U373 a U87
- studovat metabolismus ellipticin (detoxifikaci a aktivaci) v glioblastomových buněčných liniích U373 a U87

Vzhledem k tomu, že ellipticin není v současné době v klinické praxi používán vzhledem k jeho kardiotoxicitě, by jeho případné znovu-využití muselo být nutně spojeno se snížením dávky nebo jeho zacílením přímo do nádorové tkáně. Zde navrhujeme použití kombinované terapie ellipticin s antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$ . Tento nový terapeutický přístup k léčbě glioblastomu by mohl vést ke snížení terapeutické dávky ellipticin za současného zlepšení léčebných výsledků.

Hlavním cílem druhé části studie bylo navrhnout kombinační terapii antagonistou integrinu  $\alpha 5\beta 1$  a ellipticin pro léčbu glioblastomů a osvětlit její mechanismy účinku.

## Výsledky

### Část A

Obě glioblastomové linie, U87MG a U373, jsou citlivé na ellipticin. Nicméně, mechanismy, jak ellipticin inhibuje jejich proliferaci jsou různé. V buněčné linii U87MG ellipticin blokuje buněčný cyklus ve fázi G0/G1, zatímco U373 buňky jsou blokovány v S a G2/M fázi. Ellipticin vyvolává v buňkách U87MG senescenci, ne však apoptózu, zatímco v buňkách U373 je indukována apoptóza a k senescenci naopak nedochází.

Zjistili jsme, že ellipticin silně aktivuje funkční signální kaskádu tumorového supresoru p53. Po této aktivaci navozuje ellipticin senescenci spíše než apoptózu, zatímco v kontextu s nefunkčním p53 indukuje apoptózu. Zmíněné výsledky nastiňují, že rozdílné odpovědi obou testovaných buněčných linií na ellipticin vycházejí z rozdílného statutu p53.

Obě studované buněčné linie, U87MG a U373, exprimují biotransformační enzymy generující metabolity ellipticinu, které se mohou kovalentně vázat na deoxyguanosin v DNA. Tvorba těchto metabolitů ellipticinu byla pak také prokázána.

V buňkách U87MG byla navíc detekována nezanedbatelná množství dvou hlavních aduktů ellipticinu s DNA.

Dále jsme zjistili, že v buňkách U87MG ellipticine ovlivňuje svůj metabolismus tím, že indukuje expresi CYP1B1, 3A4 a 1A1. Koncentrace ellipticinu působící na tyto nádorové buňky se zdá být klíčovou pro jeho účinek. Zjistili jsme totiž, že poměr jeho aktivačních a detoxifikačních metabolitů tvořených v U87MG se při různých hodnotách koncentrací ellipticinu zásadně liší.

## Část B

V druhé části práce jsme nejprve optimalizovali podmínky terapie dvěma různými chemoterapeutiky (ellipticinem nebo temozolomidem) v kombinaci se specifickým antagonistou integrinu  $\alpha 5\beta 1$  (SJ749 nebo K34c). Zjistili jsme, že jak SJ749, tak ellipticin vykazují silnější inhibiční účink na buněčnou proliferaci buněk U87MG, pokud jsou aplikovány na buňky, které dosud nejsou přisedlé, a při nižší (2%) koncentraci séra v kultivačním médiu.

Na základě těchto výsledků byl zvolen postup podávání látek v dalších experimentech: aplikace látek v okamžiku rozsévání buněk a v 2% séru.

Oba antagonisté integrinu  $\alpha 5\beta 1$  (SJ749 a K34c) blokují buněčný cyklus buněk U87MG ve fázi G0/G1. Nicméně tento "arrest" je pouze dočasný, nepřesahující 48 hodin. V kombinaci s ellipticinem je takový blok buněčného cyklu prohlubován a prodlužován. Zatímco temozolomid blokuje buněčný cyklus spíše v S a G2/M fázích, jeho kombinace s antagonisty integrinu vede k protichůdným účinkům.

Takové výsledky podtrhují důležitost znalostí mechanismů účinku uvažovaných chemoterapeutik.

Klíčové výsledky předkládané dizertační práce odhalily zajímavou rovnováhu mezi senescencí a apoptózou v reakci na stres vyvolaný chemoterapií, v níž hraje integrin  $\alpha 5\beta 1$  důležitou roli. Přidáním antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$  je snížena senescence vyvolaná v buňkách U87MG chemoterapeutikem (ellipticin/temozolomid). Naproti tomu buňky v takovém případě umírají apoptózou.

Vzhledem k roli signální kaskády tumorového supresoru p53 indukované chemoterapií jsme studovali několik modelů s různým statutem dráhy tohoto supresoru. V kontextu funkčního p53, je jeho signalizace potlačena a modulována přidáním antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$ , což vede k upřednostnění apoptózy před senescencí. Naproti tomu v kontextu nefunkčního p53 či v případě jeho absence, kombinace chemoterapeutika a antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$  benefit oproti chemoterapii samotné nepřináší.

V práci jsme dále zjistili, že po aktivaci integrinu  $\alpha 5\beta 1$  fibronectinem reagovaly buňky U87MG na ellipticin dalším zvýšením senescence. Zvýšení exprese  $\alpha 5$  podjednotky integrinu vyústilo v rezistenci buněk U87MG k ellipticinu a temozolomidu, zatímco snížená exprese  $\alpha 5$  integrinu vedla k senzibilizaci těchto buněk na temozolomid, nikoliv však na ellipticin.

Zvýšení exprese  $\alpha 5$  integrinu v buňkách U373 (p53mt) vedlo k silné senescenci, tetraploidii a alterovanému buněčnému fenotypu.

## Diskuze

Současná onkologie stále postrádá dostatek účinných terapeutických strategií pro léčbu agresivních nádorů, jako jsou glioblastomy. Žádný z klasických přístupů nepřináší pacientům výrazné prodloužení kvalitního života. Z těchto důvodů je studium kombinace konvenčních chemoterapeutik s terapií cílenou zajímavým cílem pro řadu laboratoří včetně klinické praxe.

Předkládaná práce se zabývá studiem využití kombinací chemoterapeutika ellipticinu s antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$  v léčbě lidských glioblastomů. Ellipticine byl v

minulosti používán v klinické praxi proti některým agresivním a metastazujícím nádorům. V *in vitro* studiích pak byla prokázána jeho jistá specifita vůči nádorům mozku (Shi et al., 1998). Dřívější výsledky z naší laboratoře ukázaly, že ellipticin pravděpodobně prochází přes hematoencefalickou bariéru, neboť jeho kovalentní adukty s DNA byly detekovány v mozku experimentálního modelu, laboratorního potkana.

Ellipticin působí jako "pro-léčivo", které je metabolizováno cytochromy P450 a peroxidázami jak na detoxikační, tak na aktivační metabolity. Tyto enzymy tak ovlivňují jeho farmakologickou aktivitu specificky podle enzymové výbavy jedince i jednotlivých nádorových tkání. V tomto směru je CYP1B1 významným enzymem, který oxiduje ellipticin a zároveň byl detekován pouze v nádorové, nikoliv však ve zdravé mozkové tkáni (Murray et al., 1997). Touto selektivní oxidací ellipticinu je determinována jeho určitá specifita k nádorům.

V práci jsme prokázali senzitivitu dvou studovaných glioblastomových buněčných linií vůči ellipticinu a poukázali na důležitost statutu tumorového supresoru p53 při buněčné odpovědi na ellipticin. Přestože byly obě buněčné linie citlivé k chemoterapii ellipticinem, mechanismy jejich odpovědi byly zcela odlišné. Zatímco v buňkách U87MG exprimujících p53wt ellipticin indukoval senescenci, buňky U373, exprimující nefunkční mutant p53, umíraly po terapii ellipticinem apoptózou.

Obě studované linie exprimují biotransformační enzymy metabolizující ellipticin. Jejich exprese v buňkách U87MG je ellipticinem dokonce indukována. Tím ellipticin reguluje svůj vlastní metabolismus, stejně jako farmakologický účinek. Koncentrace ellipticinu, a tím i selektivní indukce cytochromů P450, je klíčová pro takové mechanismy účinku ellipticinu, které vyžadují metabolickou aktivaci, jako je tvorba kovalentních aduktů s DNA.

Jak již bylo uvedeno, glioblastomy jsou velmi agresivní nádory, často chemorezistentní a také silně vaskularizované. Vzhledem k tomu, že integriny jsou popisovány jako skupina molekul participujících v chemorezistenci a zároveň se účastní angiogeneze, stávají se potenciálními terapeutickými cíly. Z historických důvodů to byl zejména integrin  $\alpha\beta3$ , který se těšil největší pozornosti laboratoří jako cíl pro anti-angiogenetickou léčbu. Nicméně v posledních letech se stává mnohem zajímavějším terapeutickým cílem právě integrin  $\alpha5\beta1$ . Důvod je zřejmý, tento integrin se totiž účastní mnoha patofyziologických pochodů, jako je buněčná invaze, a



jeho exprese je vázána na stupeň agresivity nádoru i na fázi tumorigeneze. I když tento integrin hraje důležitou roli v angiogenezi, tato práce se zabývá integrinem  $\alpha 5\beta 1$  z hlediska jeho účasti v signálních kaskádách.

Za nejvýznamnější výsledek předkládané studie lze považovat poznání rovnováhy mezi senescencí a apoptózou v reakci na stres vyvolaný chemoterapií, v níž hraje integrin  $\alpha 5\beta 1$  důležitou roli. Přidáním antagonisty integrinu  $\alpha 5\beta 1$  je snížena senescence vyvolaná v buňkách U87MG chemoterapeutikem (ellipticin/temozolomid). Tyto buňky pak umírají apoptózou. Senescentní buňky mohou narozdíl od apoptotických znovu vstoupit do buněčného cyklu a proliferovat. Navíc mohou vylučovat do svého okolí růstové faktory, kterými naopak stimulují proliferaci sousedních buněk. Proto je přínos indukce senescence terapií poněkud diskutabilní. Posunutí rovnováhy ve prospěch apoptózy přináší jednoznačně větší benefit.

Antagonisté integrinu  $\alpha 5\beta 1$  specificky modulují signální dráhu proteinu p53 a použití několika různých modelů potvrdilo, že tuumorový supresor p53 hraje v regulaci rovnováhy senescence/apoptóza klíčovou roli. Poprvé jsme navíc poukázali na spojitost mezi proteinem p53 a integrinem  $\alpha 5\beta 1$ .

Stejně tak jsme odhalili nečekanou roli integrinu  $\alpha 5\beta 1$  v senescenci, jejíž pochopení bude ovšem vyžadovat další hlubší studie.

Dozertáční práce přináší originální výsledky, které prokazují přínos použití kombinace konvenčních chemoterapeutik s terapií cílenou na integrin  $\alpha 5\beta 1$  a podtrhují důležitost znalosti základních charakteristik nádoru. Přestože se protein p53 neukázal být dostačujícím predikátorem účinnosti chemoterapie glioblastomů (Leuraud et al., 2004, Weller et al., 1998), "screening" exprese integrinu  $\alpha 5\beta 1$  a sledování statutu p53 by mohly v tomto směru vést k lepším výsledkům a návrhům nových terapeutických přístupů.

## Bibliografie

Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M (2000). Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 6: 96-101.