

AZ ANGIOSTATIN FELHASZNÁLÁSI LEHETŐSÉGEI A TUMORELLENES TERÁPIÁBAN

Szabó Bálint Gergely

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi
Kar, Magyarország, Budapest

Tóvári József

Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai
Osztály, Magyarország, Budapest

Marton Annamária

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet,
Magyarország, Szeged

Vizler Csaba

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet,
Magyarország, Szeged

Tímár József

Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet,
Magyarország, Budapest

Szilák László

Nyugat-magyarországi Egyetem, TTK Biológiai
Intézet, Magyarország, Szombathely

AZ ANGIOSTATIN FELHASZNÁLÁSI LEHETŐSÉGEI A TUMORELLENES TERÁPIÁBAN

Absztrakt

A tumorok angiogenezissel csatlakoznak a vérérhálózathoz, a folyamat gátlásával tumorsejtpusztulás idézhető elő. Az angiostatin – mely endogén angiogenezis-inhibitor – instabil, terápiás felhasználásra nem alkalmas. Célunk olyan stabil molekula tervezése, amely *in vivo* és *in situ* képes aktív angiostatint termelni. Létrehoztunk egy elasztáz–angiostatin kiméra konstrukciót, mely az extracelluláris térben proteolízissel felszabadítja az angiostatint. A konstrukciót kódoló plazmid és sejtvonalak felhasználásával *in vitro* és *in vivo* angiostatintermelést valósítottunk meg. Molekulánk szövettényésztési kísérletekben és állatmodellekben is tumorrepresszív hatásúnak bizonyult.

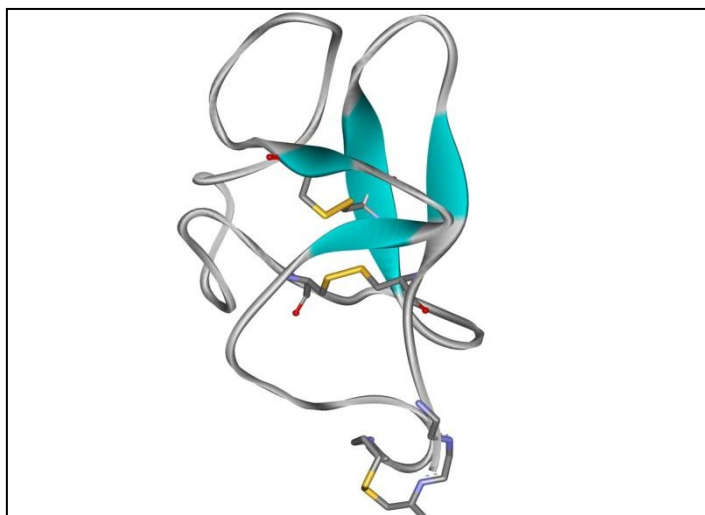
Kulcsszavak: angiostatin, kringle, kiméra, angiogenezis, tumorrepresszió

Bevezetés

A tumorok növekedésének egyik feltétele a vérérhálózathoz való csatlakozás. A tápanyag- és oxigénellátás kiépítésére a daganatok leggyakrabban valószínűleg érújdonképződést (neoangiogenezt) indukálnak: a hipoxiás tumorsejtek angiogén faktorokat (VEGF, bFGF, TGF β , PDGF stb.) termelnek, melynek eredményeképp a daganattal szomszédos venulák falában az endothelsejtek proliferálnak és infiltrálnak a tumorszövetbe. Következő lépésben a bazális membrán regenerálódik, végül a pericyták behüvelyezik az új kapillárist (Kopper 2011, 16). A neoangiogenezissel létrejött erek permeábilisabbak, vakon végződőek, és gyakran keveredik bennük az artériás és vénás vér (Vaupel 1998).

A klinikumban ismert jelenség, hogy egyes primer tumorok sebészi rezekcióját követően a metasztázisok robbanásszerű növekedésnek indulnak. A megfigyelés széles körben elfogadott magyarázata szerint a meglévő mikrometasztázisok a primer tumor jelenlétében nem ereződnek, mivel az elsődleges daganat különféle antiangiogén faktorokat termel. *Folkmann és mtsai.* két ilyen – döntően a tumorstroma által felszabadított – anyagot izolált: az endostatint és az angiostatint (O'Reilly 1994).

Az angiostatin a fibrinolízis kulcsenzimének, a plazminogénnek proteolízis útján keletkező degradációs terméke. A plazminogén N-terminálisán öt kesztyűujszerű domain, ún. kringle található (1. ábra).



1. ábra: Egy kringle domain szerkezete

Az irodalom leírása szerint az 1-3., ritkábban az 1-4. kringle-eket tekintik angiostatinnak, de az 5. kringle is rendelkezik mérhető antiangiogén

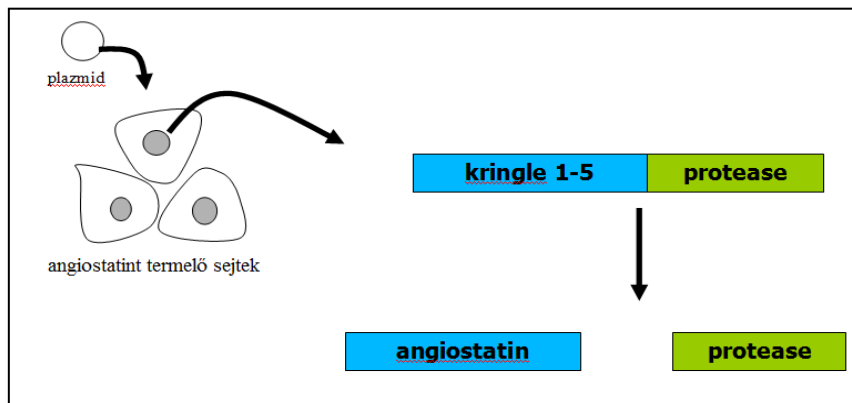
hatással (Liu 2000). Az angiostatin felszabadítását az aktív plazmin is végezheti autokatalízissal, de molekulát a plazminogénről számos egyéb proteáz (elasztáz, kallikrein, MMP-k, PSA, endopeptidázok, katepszinek stb.) is lehasíthatja (Wahl 2005).

Jelen tudásunk szerint az angiostatin számos fehérjéhez képes kötődni, ezek közül kiemelkedő szerepű az angiomotin, mely az endothelsejtek növekedési faktorok irányába történő migrációját szabályozza. Emellett a molekula ismerten kötődik a sejtfejszíni (azaz ectopiás lokalizációban lévő) ATP-szintázhoz, az $\alpha_5\beta_3$ integrinhez, a II-es típusú annexinhez, a c-met/HGF-receptorhoz, a CD26/DPP4-hez és néhány proteoglycanhoz. Az angiostatin pontos hatásmechanizmusa máig nem ismert, de az endothelialis migráció és proliferáció gátlása, valamint az apoptózisindukció kulcsfontosságú mozzanatnak bizonyul a folyamatban (Cao 1998).

Sajnos az angiostatin terápiás felhasználása nehézségekbe ütközik. Egyrészt a molekula *in vivo* féléletideje igen rövid (kb. 15 perc), másrészt idáig nem sikerült nagy mennyiségű, oldható, aktív angiostatint előállítani baculovirus, *E. coli*, élesztő vagy emlős sejtvonalak, expressziós rendszerek segítségével (Liu 200, Moser 2004). Az angiostatin klinikai bevezetése mégis kívánatos lehet több ok miatt. A jelenleg törzkönyvezett angiogenezis-inhibitorok – melyek monoklonális antitestek (bevacizumab) és multikináz-inhibitorok (pl. sunitinib, sorafenib) – a VEGF/VEGF-receptor útvonalon keresztül hatnak. Emellett fontos hangsúlyozni, hogy ezen antiangiogén gyógyszerek indikációs területe egyre inkább a metasztatikus tumorokra szűkül, a klinikai használat során pedig a kialakuló rezisztencia és a súlyos mellékhatások (pl. vérzés, perforáció, hypertonia, kardiális problémák stb.) jelentenek problémát (Kopper 2011, 46). Ezzel szemben az angiostatin a fentebb részletezett targetekkel új terápiás útvonalat biztosítana, továbbá az *in vivo* kísérletek tanulsága szerint az angiostatinnal tartósan kezelt daganatos állatokban sem toxikus mellékhatásokat, sem *de novo* rezisztenciát nem figyeltek meg (Cao 1998).

Célkitűzések

Célunk olyan hatékony és stabil molekula tervezése, amely *in vivo* és *in situ* megfelelő koncentrációban képes aktív angiostatint termelni. Létrehoztunk egy proteáz–angiostatin kimérát, mely a transzfektált sejtben expresszálódik, exportra kerül, majd az extracelluláris térben aktiváció után proteolízissel felszabadítja az angiostatint (2. ábra).



2. ábra: A konstrukció *in vivo* lokálisan szabadítja fel az angiostatint

A kiméra terápiás előnyei miatt az onkológiai gyakorlatban tűnik hasznosíthatónak. Elsősorban a kimérát kódoló nukleinsav-konstrukcióval végzett *ex vivo* mesenchymalis őssejtterápiát, valamint szolid tumorok direkt injekcióját képzeljük el.

A tanulmányban bemutatott molekula szabadalmaztatása egy időben történik az Európai Unió és az USA szellemi tulajdon védelmével foglalkozó hivatalaiban (PCT 20130101/0.20.5.20).

Anyagok és módszerek

A jelen munkánk során bemutatott kimérafehérje funkcionálisan két alegységből áll: a proteázból, valamint a hozzá proteázszenzitív linkerrel átkapcsolt, 1-3. kringle domainból szerveződő angiostatinból.

Tervezett konstrukciónkban a humán neutrophil elasztázt (ELA2, EC 3.4.21.37) választottuk proteáznak, mivel bizonyítottan hasítja a kringle domaineket (Wahl 2005), az emberi szervezetben fiziológiásan megtalálható, így immunogenitása kicsi, szignálpeptidje révén exportra kerül a sejtből, valamint aktivációs helye ismert. A végleges konstrukcióban a proteáz a molekula N-terminálisára került, mivel teljes katalitikus aktivitását csak ebben a helyzetben detektáltuk. Az elrendezés további előnye, hogy az enzim szekréciós szignálja intakt marad, vagyis a kimérafehérje exportra kerülhet a sejtől. Az angiostatin és a proteáz szekvenciáit 3-15 aminosav hosszúságú linker választja el, mely a hasítási helyet is tartalmazza. Megjegyezzük, hogy további linkerek és specifikus hasítási helyek tervezésével a konstrukció szabályozása finomhangolható. A kimérafehérjében a proteolízis monomolekuláris reakció során autokatalízissal megy végbe.

Ismert molekuláris biológiai módszerekkel, PCR-rel amplifikált angiotensin (1-3. kringle) és elasztáz cDNS-t a megfelelő restriktációs endonukleázokkal történő emésztés után azonos leolvasási keretben a Clontech Laboratories módosított pCMV/T7 vektorába ligáltuk. A plazmidkonstrukció tartalmazta a bakteriális és eukarióta expresszióhoz és a tisztításhoz szükséges elemeket. A ligálást a gyártó ajánlása szerint végeztük 20 µl össztérfogatban, 1 µl vektor és 4 µl inzert összemérésével, 1 IU ligáz jelenlétében. Kontrollként inzert nélküli, csak vektort tartalmazó reakciót is végeztünk. A ligálást 24 órán át, 4 °C-on folytattuk.

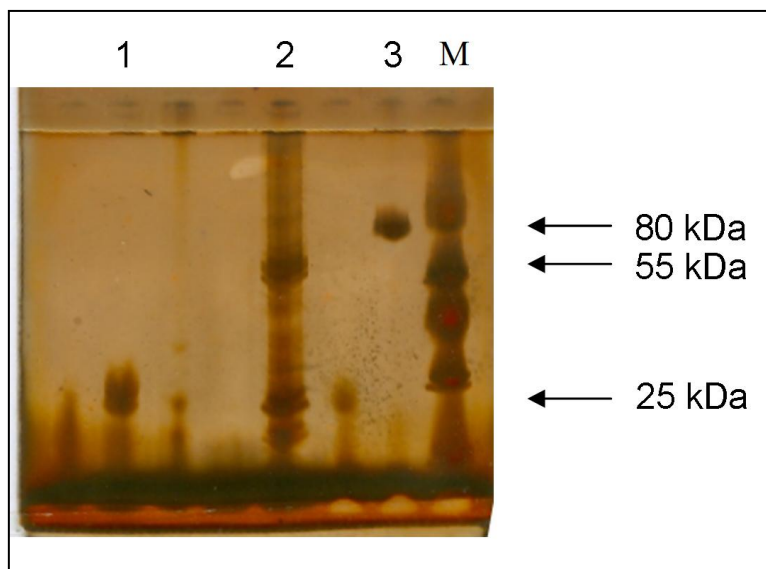
A ligálást követően a konstrukciónkat kódoló rekombináns plazmidokat kompetens *E. coli* (DH5α) transzformáltuk (100 µl sejtsuszpenzióhoz 1 µg plazmid hozzáadása, majd 10 perc jeges inkubálás után 37 °C-os, 5 perces hősok, végül ismételt jeges fürdő). A plazmidok felszaporítása és kitisztítása után a konstrukció DNS-szekvenálással ellenőriztük, majd a korrekt vektorral *in vitro* és *in vivo* angiotensin-termelés megvalósítására *E. coli* törzset (BL21), humán (HEK293) és egér (4T1 és C26) sejtvonalakat fertőztünk. Az eukarióta sejteket Lipofectamin LTX (Invitrogen) felhasználásával transzfektáltuk, majd stabil transzfektánsokat hoztunk létre G418-rezisztens klónokból a további kísérletekhez.

Aortatesztet végeztünk, melyben 4-6 hetes patkányokból eltávolított, adventitiájuktól fosztott, 1 mm vastagra vágott és Matrigelbe (Sigma) ágyazott aortagyűrűk 25 ng/ml VEGF hozzáadásával indukált endothelproliferációját monitoroztuk 6 napig fázismikroszkóppal a kimérát termelő humán sejtvonal jelenlétében. A plazmidot 4T1 és C26 egér carcinomavonalakba transzfektáltuk, majd 2-3 hónapos nőstény BALB/c egereket subcutan injektáltunk 100.000 sejttel (100 µl PBS-ben szuszpendálva), a tumorképződést időben követtük. A primer tumorok átmérőit digitális caliperrel, a metasztázisokat a terminálás után a teljes tüdőtömeg mérésével detektáltuk. Kontrollnak vad típusú, azaz transzfektálatlanul hagyott, valamint csak az inzert nélküli plazmiddal transzfektált sejteket alkalmaztunk.

Eredmények

A kimérát először *in vitro* transzformált *E. coli* (BL21) rendszerben expresszáltattuk. Az indukció (OD₆₀₀=0,5-nél 0,2 mM IPTG-vel 6-8 órán át rázatva) után a baktériumokat feltártuk (fagyasztás-olvasztás és vékony hegyű pipettán való átnyomás 3x, majd oldás 6M guanídium-HCl-ban teljes denaturálódásig). A citoplazmatikus zárványtestekben dúsuló kimérafehérjét szuszpendáltuk és renaturáltuk (redukált, oxidált glutationt és ureát megfelelő arányban és koncentrációban tartalmazó pufferrel), majd poli-lysine oszlopon tisztítottuk. A tisztított minta egy részét serin-proteáz inhibitor jelenlétében eluáltuk, míg másik részét anélkül. Konstrukciónk autokatalízisét ezután SDS-

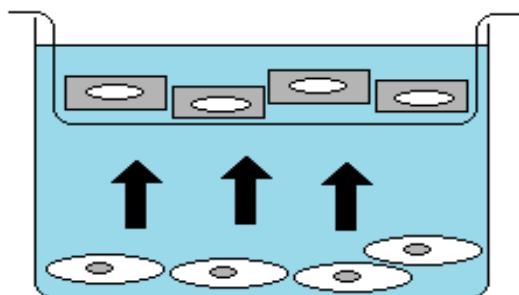
PAGE-gel (futtatás 10% akrilamid gélen 45 percig, 200 V-tal) értékeltük (3. ábra).



3. ábra: A bakteriális expresszió során nyert minták elektroforetikus képe ezüsfestés alkalmazása után

Megfigyelhetjük, hogy proteázinhibitor jelenléte mellett (3. ábra, 3. oszlop) a teljes kimérát (80 kDa), proteázinhibitor hiányában (3. ábra, 2. oszlop) a hasított angiotatint (55 kDa) és az elasztázt (25 kDa) detektáltuk, így molekulánk *in vitro* működőképességét igazoltuk. A 3. ábra 1. oszlopában kontrollként termeltetett, tisztított és futtatott elasztáz, míg az „M”-mel jelölt oszlopban ismert hosszúságú fragmenteket tartalmazó referenciaminta (DNS-létra) futott.

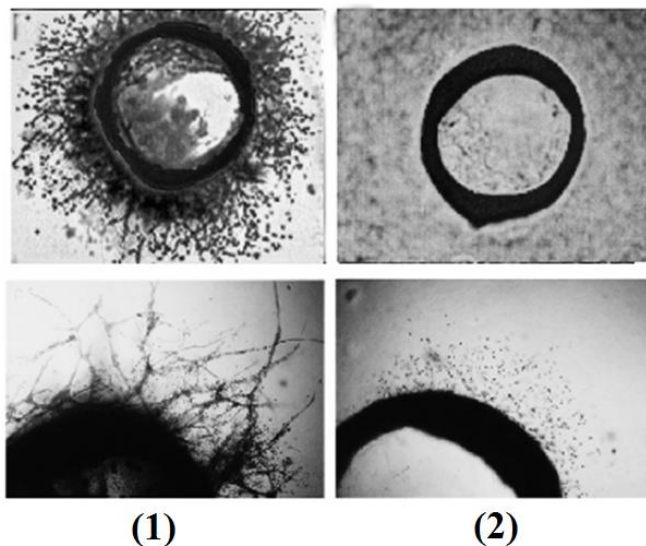
In vitro szövettenyészetes kísérletünket függőcsepp-kultúrában végeztük: az edény aljában a konstrukciónkkal transzfektált HEK293 sejtvonalat helyeztünk, ezen tenyésztettel azonos víztérben, de fizikailag szeparálva a betéten humán endothelialis sejtvonal (HMVEC-d) növekedett (4. ábra).



4. ábra: Függőcseppkultúra vázlatos felépítése

Kontrollnak vad típusú HEK293 sejteket választottunk hasonló elrendezésben. A közös folyadéktérben megjelenő angiostatin hatására az endothelsejtek proliferációja, migrációja gátlódott a kimérát termelő sejtvonal jelenlétében. Ezen sejtek feletti tápoldatból az angiostatin jelenléte anti-angiostatin antitesttel végzett indirekt ELISA-val igazolható volt.

Az aortateszt során megfigyeltük, hogy a vizsgálati időszak alatt a transzfektált sejtekkel fedett Matrigelben (5. ábra, 2. oszlop) az aortagyűrűből történő érújdonképződés szignifikánsan elmaradt a kontrollhoz (5. ábra, 1. oszlop) viszonyítva.

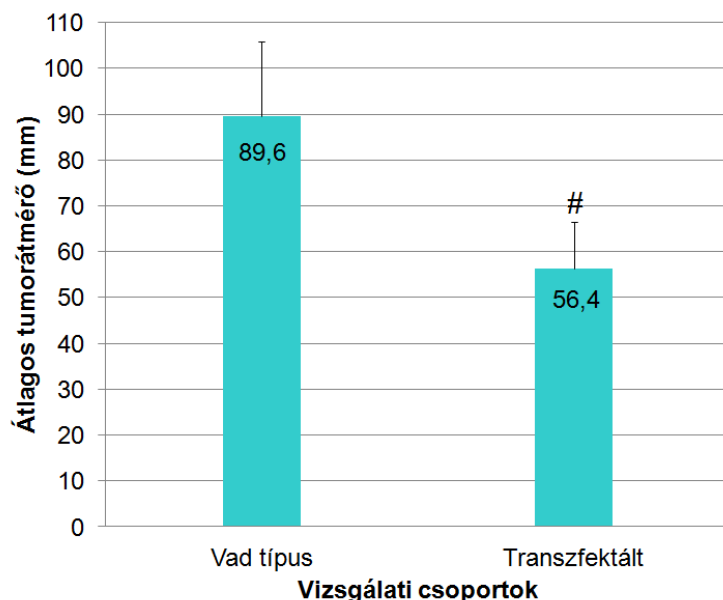


5. ábra: A konstrukció gátolja az endothelproliferációt az aortatesztben (fázismikroszkópos felvételek a 6. napon, 4-10-szeres nagyítás)

A jelenséget a vágott felszínből induló endothelnövedékek számának és hosszának mérésével kvantifikáltuk. Az angiostatin a Matrigelre öntött és 3 naponta cserélt endothelialis-SFM (ESFM) felülűszójából kimutatható volt.

Az *in vivo* tumornövekedést a 4T1 és C26 sejtek 20-20 független klónvonalán vizsgáltuk.

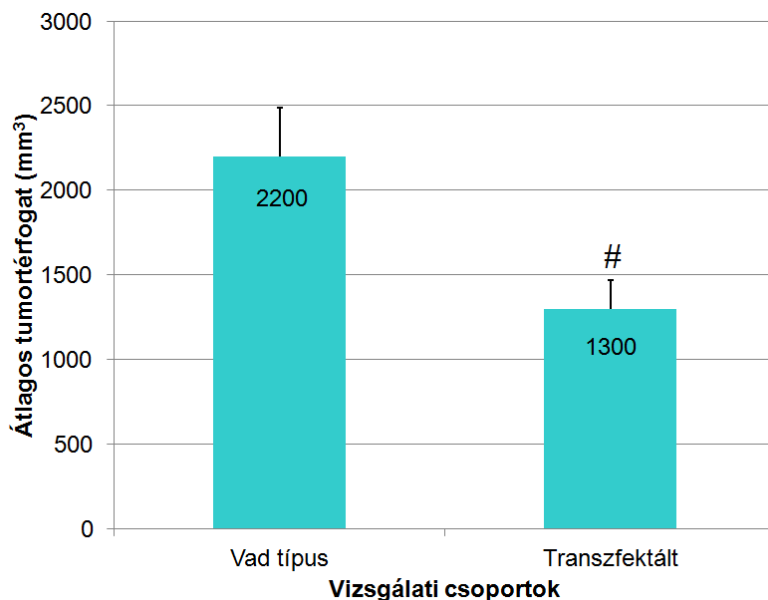
Az első kísérlet során 5 állatot vad típusú, míg másik ötöt a konstrukciónkkal transzfektált 4T1 sejtekkel injektáltunk. A primer 4T1-tumorok átmérőinek időbeli követése során kirajzolódott, hogy a 10. napra a kontrollállatoknál már volt elhullás a tumornövekedés miatt, a kimérát termelő sejtekkel inokulált egerekben azonban nem. Utóbbi csoportban csak a 10. nap után indult meg a tumorprogresszió, mely végig kisebb sebességgel zajlott. A 15. napon történt terminálás után a két állatcsoportban mért átlagos tumorátmérőkben szignifikáns különbség ($p < 0.05$) mutatkozott (6. ábra).



6. ábra: A 4T1 vonal primer tumorainak átlagos átmérői a 15. napon történő termináláskor (2x5 egér, #: $p < 0,05$ vs. kontroll, kétmintás t-próba)

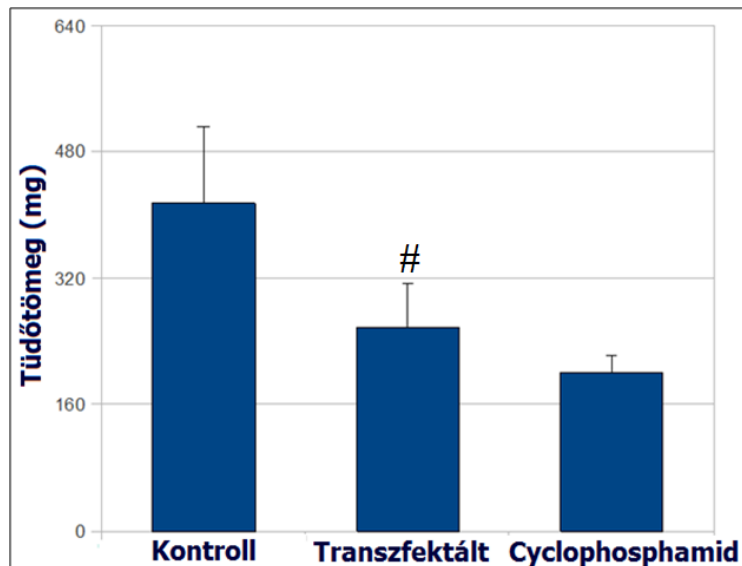
A második kísérletben 5 újabb egeret vad típusú, 5 állatot pedig a konstrukcióval transzfektált C26 sejtekkel fertőztünk. A primer C26-tumorok átlagos méreteinek vizsgálatakor megfigyeltük, hogy az angiostatint termelő sejteket hordozó állatokban – a kontrollállatokkal ellentétben – a 21. napig nem történt daganatprogresszió. A 21. naptól kezdve a vizsgálati csoportban is megindult a tumorok növekedése, de kisebb térfogatértékek mellett. A 32.

napon végzett terminálás után a két állatcsoportban mért átlagos tumorvolumenekben szignifikáns különbség ($p < 0.05$) mutatkozott (7. ábra).



7. ábra: A C26 vonal primer tumorainak átlagos térfogatai a 32. napon történő termináláskor (2x5 eger, #: $p < 0,05$ vs. kontroll, kétmintás t-próba)

A 4T1-vonal esetén vizsgáltuk a tüdőmetasztázisok méreteit is. 10 egeret vad típusú sejtekkel injektáltunk, és semmilyen terápiát nem alkalmaztunk (kontrollcsoport), 10 egeret szintén vad 4T1-sejtekkel fertőztünk, de cyclophosphamid terápiában részesítettük őket (cyclophosphamid csoport), míg másik 10 állatot (transzfektált csoport) a konstrukcióval transzfektált tumorsejtekkel oltottuk. A 14. napra az állatokat termináltuk, majd boncolás után lemértük a makroszkóposan láthatóan megszórt tüdőket. A kontrollcsoport átlagos tüdőtömegéhez viszonyítva a transzfektált csoportban szignifikánsan kisebb ($p < 0.05$) tömeget mértünk, mely megközelítette a cyclophosphamid csoport átlagos tüdőtömegét (8. ábra).



8. ábra: A 4T1 vonal tüdőmetasztázisainak átlagos tömegei a 14. napon történő termináláskor (3x10 egér, #: $p < 0,05$ vs. kontroll, kétmintás t-próba)

A kétféleképp létrehozott – transzfektálatlanul hagyott, valamint inzert nélküli plazmiddal transzfektált – vad típusú sejtvonalból kifejlődő daganatok között egyik kísérletben sem volt mérhető különbség a kontrollcsoporton belül (ez mind a 4T1-, mind pedig a C26-sejtvonal esetén érvényesült).

Következtetések

Megállapíthatjuk: sikerült a célkitűzésünknek megfelelő konstrukciót létrehozni. Molekulánk egy olyan angiostatin-elasztáz kiméra, mely a transzfektált sejtben expresszálódik, onnan exportra kerül az extracelluláris térbe, majd terv szerint aktív angiostatint szabadít fel. A kiméra mind *in vitro* szövettenyésztési, mind *in vivo* állatmodellekben tumorrepresszív hatást fejt ki.

Az *in vivo* állatkísérletek jelenleg is folynak, célunk a tumorszövetbe történő DNS-transzfekció pontosítása, a molekula távolhatásainak jellemzése, valamint kotranszfekció más tumorrepresszív faktorokkal. Jövőbeli tervünk között szerepel a szabályozás finomhangolása, valamint izolált mesenchymalis sejtekbe történő transzfektálás.

Irodalomjegyzék

- Kopper, László, József Tímár, Péter Becságh, Zsuzsanna Nagy eds. 2011. *Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 2.*, Budapest: Semmelweis Kiadó.
- Pollan, Michael. *The Omnivore's Dilemma: A Natural History of Four Meals*. New York: Penguin, 2006.
- O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 79:315-328.
- Wahl M.L., Moser T.L., Pizzo S.V. 2004. Angiostatin and anti-angiogenic therapy in human disease. *Progress in Hormone Research*. 59:73-104.
- Wahl M.L., Kenan D.J., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V. 2005. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *Journal of Cellular Biochemistry*. 96:242-61.
- Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. 1998. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors. *Cancer Research* 49:6449-6465.
- Liu W., Ahmad S.A., Reinmuth N., Shaheen R.M. 2000. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor. *Apoptosis* 5:323-328.
- Moser T.L., Stack M.S., Wahl M.L., Pizzo S.V. 2002. The mechanism of action of angiostatin: Can you teach an old dog new tricks? *Thrombosis and Haemostasis*. 87:394-401.
- Cao Y., O'Reilly M.S., Marshall B., Flynn E., Ji R.W., Folkman J. 1998. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *Journal of Clinical Investigation*. 101(5):1055-1063.