

Receptory śmierci

– cel molekularny leków przeciwnowotworowych

prof. dr hab.
ZDZISŁAW CHILMONCZYK
Narodowy Instytut Leków,
Zakład Biologii Komórki
Uniwersytet Rzeszowski,
Instytut Pielęgniarstwa



Fot. K. KALŃSKI

Streszczenie:

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu ssaków. Jej brak lub zaburzenie jej funkcjonowania mogą mieć bardzo poważne skutki prowadząc na przykład do procesu nowotworzenia. Komórki nowotworowe to takie, które nie chcą ulegać apoptozie. Jednym z czynników uruchamiających proces apoptotycznej śmierci komórki jest aktywacja receptorów śmierci. Receptory te wydają się zatem być naturalnym celem molekularnym dla leków przeciwnowotworowych. Jednakże ich endogenne ligandy charakteryzują się dużą toksycznością systemową. Pomimo to, w ostatnich latach prowadzono wiele prac dotyczących badania ligandów i aktywacji tych receptorów. Otrzymano cały szereg ligandów wykazujących obiecujące aktywności przeciwnowotworowe, ale też okazało się, że niektóre z nich nie wykazały się oczekiwaną efektywnością kliniczną.

Słowa kluczowe:

leki przeciwnowotworowe, apoptoza, receptory śmierci, TNF- α , Fas, TRAIL

Summary:

Apoptosis – programmed cell death (PCD) – plays crucial role in normal development of mammals. Its lack or malfunctioning may have fatal consequences leading for instance to carcinogenesis. Cancer cells do not undergo apoptosis. One of the elements triggering PCD is death receptor activation. They therefore seem to be natural molecular target for anticancer drugs. However, their endogenous ligands suffer of high systemic toxicity. In spite of that recently much concern has been paid to the examination of the receptors activation and preparation of their ligands. Different compounds exhibiting interesting anticancer activity have been obtained. It has also been found that some of them did not prove their clinical efficacy.

Key words:

anticancer drugs, apoptosis, death receptors, TNF- α , Fas, TRAIL

czy też regresja nowotworu. Termin pochodzi od greckich słów *apo* – oddzielony od czegoś i *ptosis* – padać i znaczy „opadać” (jak liście z drzew).

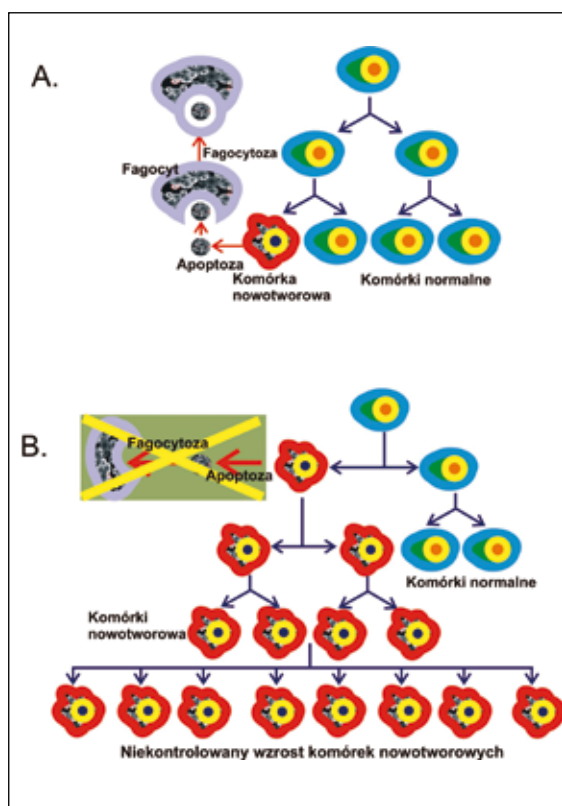
Apoptoza to sposób na usuwanie niepotrzebnych, zużytych lub uszkodzonych komórek, w szczególności tych,

Mechanizmy apoptozy

Proces zaplanowanej śmierci komórki regulowany jest poprzez odpowiednią ekspresję pro- i antyapoptotycznych białek, których względne ilości decydują o jej podatności na apoptozę. Po różnorodnie przebiegającej fazie inicjacji apoptozy za-

chodzi faza wykonawcza, zależna od enzymów proteolitycznych z grup kaspaz, dokonujących degradacji różnych białek komórkowych. Kaspazy, oznaczane cyframi arabskimi, w komórce nieapoptotycznej występują w postaci nieaktywnej, jako tzw. prokaspazy (inaczej proenzymy lub zymogeny). Ich aktywacja zapoczątkowuje jeden ze szlaków zaprogramowanej śmierci komórki. Teraz następują szybkie, o zorganizowanym charakterze, zmiany w jądrze komórkowym – chromatyna jądrowa ulega kondensacji, a DNA zostaje pocięte przez endonukleazy. Następuje dezintegracja cytoszkieletu, komórka apoptyczna zaokrąglą się, traci kontakt z podłożem,

rozwijają się na jej powierzchni liczne uwypuklenia. Komórka ulega fragmentacji, tworzą się tzw. ciała apoptotyczne, które są następnie fagocytowane przez komórki żerne.



Rys. 1. Usunięcie komórki nowotworowej w procesie apoptozy (A) i niekontrolowane namnożenie komórek nowotworowych w przypadku wadliwego funkcjonowania apoptozy (B).

które mogłyby stać się groźne dla organizmu gospodarza (jak np. komórki nowotworowe). Jest zaplanowaną śmiercią, samobójstwem komórki – zjawiskiem naturalnym w rozwoju i życiu organizmów. Gdy mechanizmy apoptozy zawodzą, może dojść do namnożenia komórek nietypowych i procesów nowotworzenia (Rys. 1). Jest zatem rzeczą bardzo istotną, aby te procesy zachodziły w sposób niezaburzony, a w przypadku ich braku, nastąpiło przywrócenie normalnego funkcjonowania.

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w wielu procesach takich jak embriogeneza, metamorfoza, homeostaza komórkowa, atrofia tkanek

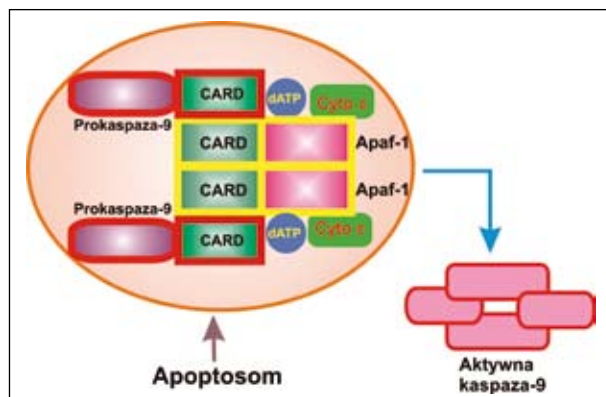
Są zatem dwie główne drogi inicjacji apoptozy: ● droga mitochondrialna („wewnętrzna”) oraz ● w wyniku aktywacji receptorów śmierci („zewnętrzna”).

Większość bodźców drogi wewnętrznej prowadzi do zachwiania równowagi między białkami proapoptotycznymi i antyapoptotycznymi, niezbędnej do zachowania prawidłowego rozwoju komórki. Wówczas nadmiar białek proapoptotycznych wywołuje zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej, czego skutkiem jest uwolnienie z mitochondrium cytochromu c, sekwestracja czynnika Apaf-1, prokaspazy-9 oraz dATP (trifosforan deoksyadenozyny). Składniki te tworzą tzw. apoptosom (Rys. 2), aktywujący kaskadę kaspaz – białek proteolitycznych (proteaz) – czego skutkiem jest destrukcja komórki.

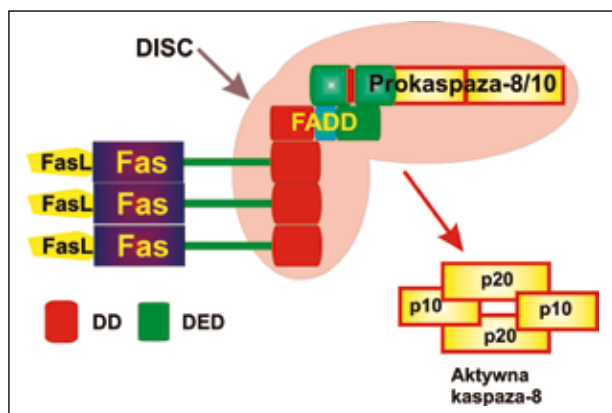
Receptory śmierci, uruchamiające szlaki apoptozy, posiadają konserwatywne domeny o wysokiej homologii. Należą do nich bogate w cysteinę domeny zewnątrzkomórkowe oraz około

80-aminokwasowe domeny wewnątrzkomórkowe – tzw. domeny śmierci (ang. *death domain* – DD) – niezbędne do bezpośredniej aktywacji apoptotycznego programu komórki. Wszystkie receptory zawierające wewnątrzkomórkowe domeny śmierci, w obecności cytozolowych białek adaptorowych, również zawierających domeny śmierci, mogą uruchamiać program apoptozy. Aktywacja receptorów śmierci prowadzi do ich trimeryzacji, przyłączenia części wewnątrzkomórkowych domen śmierci białek adaptorowych zawierających domeny śmierci oraz efektorowe domeny śmierci (ang. *death effector domain* – DED). Z kolei białka zawierające efektorowe domeny śmierci przyłączają prokaspazę-8 (lub 10), zymogen

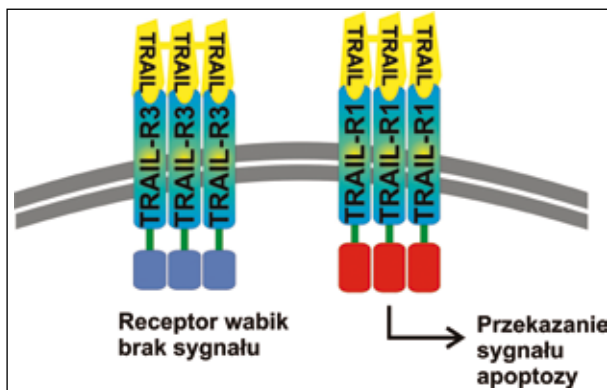
śliwego guza litego po lokalnym podaniu paciorkowca (*Streptococcus pyogenes*) wywołującego różę (*erysipelas*) (1891). W 1892 r. Coley zaczął stosować streptokoki po obróbce termicznej z dodatkiem również inaktywowanej termicznie Gram ujemnej pałeczki krwawej (*Serratia marcescens*). Mieszanina ta zyskała mianem



Rys. 2. Schemat obrazu apoptosomu i aktywacji kaspazy-9 (CARD: *caspase recruitment domain* – domena wychwytyjąca kaspazy; Apaf-1: *apoptotic protease activating factor-1* – czynnik-1 aktywujący proteazy apoptotyczne).



Rys. 3. Schematyczny obraz DISC i aktywacji kaspazy-8 (Fas: receptor dla czynnika Fas; FasL: ligand receptora Fas; FADD: białko adaptorowe – ang. *fas associated death domain* – domena śmierci sprzężona z Fas; DD – domena śmierci; DED – efektorowa domena śmierci).



Rys. 4. Receptor R3 dla czynnika TRAIL (TRAIL-R3 = DcR1) nie posiada wewnątrzkomórkowych domen śmierci. Przyłączenie czynnika TRAIL nie powoduje aktywacji szlaku apoptozy.

proenzym) proteolityczny również zawierający efektorowe domeny śmierci. Powstaje w ten sposób promujący apoptozę kompleks zwany DISC (ang. *death inducing signalling complex* – kompleks sygnalny indukujący śmierć) (Rys. 3). Aktywacja DISC prowadzi do uwolnienia aktywnego enzymu proteolitycznego (kaspazy-8), czego skutkiem jest dalsza aktywacja kaskady kaspaz oraz apoptotyczna śmierć komórki.

Receptory śmierci

Receptory śmierci należą do nadrodziny receptorów TNF (TNF – *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów). Historia TNF rozpoczęła się pod koniec XIX w., kiedy to William Coley, chirurg z Nowego Jorku, zaobserwował regresję zło-

no toksyny Coley’a. Badania wykazały, że regresja nowotworów indukowana była przez lipopolisacharydy, elementy ściany komórkowej bakterii. Podanie tych polisacharydów zwierzętom laboratoryjnym powodowało krwotoczną martwicę włókniakomięsaka (*fibrosarcoma*) wywołanego metylocholanrenem. W 1975 r. wyizolowano białko odpowiedzialne za ten proces i nazwano je „*tumor necrosis factor alpha*” – TNF- α . Obecnie substancja ta – TNF- α (kachektyna) – jest dopuszczona przez EMA do miejscowego leczenia nowotworów litych, nie może być jednakże stosowana układowo, ze względu na wysoką toksyczność. Podana zwierzętom wywołuje zespół letalnego szoku z zapaścią sercowo-naczyniową. Badania kliniczne wykazały, że główną przyczyną tego szoku jest oporna hipotensja.

Jest wiele receptorów śmierci. Należą do nich między innymi receptor dla TNF- α (TNF-R1), receptor Fas (opisany przez Yoneharę i wsp. w 1989 r. jako antygen dla przeciwciała IgM) oraz receptory dla TRAIL (TRAIL: *TNF-related apoptosis inducing ligand* – związany z TNF ligand indukujący apoptozę). Te ligandy aktywujące receptory śmierci należą do grupy cytokin. Są to rozpuszczalne w wodzie białka i glikoproteiny sygnałowe (głównie o masie 8-30 kDa) wpływające na wzrost, proliferację i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej oraz komórek he-

mopoetycznych. Każda cytokina wiąże się ze specyficznym receptorem na powierzchni komórki powodując *up-* lub *down-* regulację różnych genów i czynników transkrypcyjnych. TNF- α , ligand receptora Fas (FasL) oraz czynnik TRAIL to ligandy posiadające potencjalną zdolność aktywacji apoptozy, co może być wykorzystywane w terapii nowotworów. Należy tu jednakże zaznaczyć, że nie wszystkie receptory z tej grupy zawierają domeny śmierci. Niektóre receptory dla TRAIL (np. TRAIL-R3, TRAIL-R4, DcR3) posiadają zewnątrzkomórkowe domeny przyłączające ligand, ale nie posiadają wewnętrzkomórkowych domen śmierci (Rys. 4). Są to tzw. receptory wabiki (ang. *decoy receptors*). Przyłączenie czynnika TRAIL przez te receptory nie powoduje aktywacji szlaku apoptozy.

Leki przeciwnowotworowe

TNF- α jest jedną z niewielu cytokin, które znalazły kliniczne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Jednakże ze względu na silne działanie toksyczne po podaniu układowym, jest on stosowany jedynie w miejscowym leczeniu nowotworów. Podobnie kształtuje się toksyczność ligandu Fas. Z powodu dużego stężenia Fas na powierzchni hepatocytów, ligand aktywujący receptor Fas (FasL), wykazuje bardzo silną toksyczność w stosunku do wątroby, dając objawy podobne do jej ostrego zapalenia. Taka toksyczność nie występuje u TRAIL, co stawia go w rzędzie obiecujących, potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Minusem TRAIL jest to, że pewne nowotwory wykazują względem niego oporność.

Dla wszystkich trzech grup receptorów śmierci (TNF-R1, receptor Fas, receptory dla czynnika TRAIL) prowadzone są prace dotyczące ligandów modyfikowanych lub agonistycznych przeciwciał monoklonalnych, jako połączeń o zmniejszonej toksyczności i zwiększonej efektywności. Poszukuje się również związków zwiększających efektywność ligandów tych receptorów, wspomagających ich działanie poprzez blokowanie niektórych szlaków promujących przeżycie komórki.

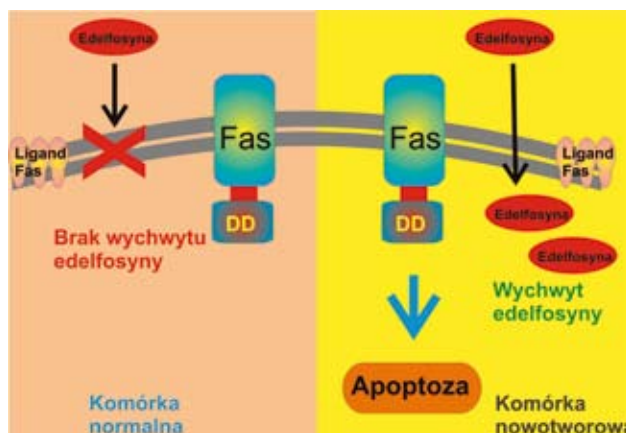
Dla receptorów TNF-R1, pracowano nad strategią opartą na tworzeniu koniugatów TNF- α z innym białkiem – np. z przeciwciałem – lub ligandem rozpoznającym markery na powierzchni nowotworu lub naczyń krwionośnych no-

wotworu. W ostatnich dziesięciu latach otrzymano wiele koniugatów TNF- α z przeciwciałami, dających efekt wzbogacenia TNF w tkance nowotworowej, a tym samym i zwiększonej aktywacji receptorów dla TNF w tej tkance. Koniugaty te nakierowane były na takie antygeny znajdujące się na komórkach nowotworowych jak: ● receptor dla czynnika wzrostu naskórka (EGFR), ● antygen Her2/NEU, ● antygen gp240 czerniaka złośliwego, ● antygen karcyno-embryonalny (CEA) i ● jednoniciowe DNA uwalniane z umierających komórek w obszarze nekrotycznym nowotworu. Dla wielu z tych połączeń badanie farmakokinetyki wykazało wzbogacenie w układzie krew-nowotwór rzędu 8 do 700. Obserwowano również zwiększoną odpowiedź nowotworu oraz zmniejszoną toksyczność ogólną w stosunku do niemodyfikowanego TNF- α . Jako przykład podać można koniugat TNF- α o charakterze proleku. Zawiera on TNF- α , dołączone fragmenty receptora TNF oraz lekkiego i ciężkiego fragmentu odpowiedniej immunoglobuliny (oznaczony jako scFv-TNF- α). Uwolnienie proleku następuje w komórkach nowotworowych, gdzie jest on rozpoznawany i aktywowany przez specyficzne proteazy nowotworowe.

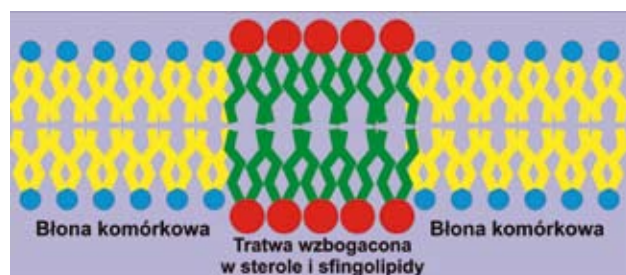
Czynnik TRAIL

Wiadomo, że czynnik TRAIL selektywnie zabija komórki nowotworowe. Komórkowe i molekularne podłoże tej selektywności nie jest w pełni zrozumiałe. Może to być spowodowane zwiększoną ekspresją receptora dla TRAIL w komórkach nowotworowych lub względnie wysokim poziomem re-

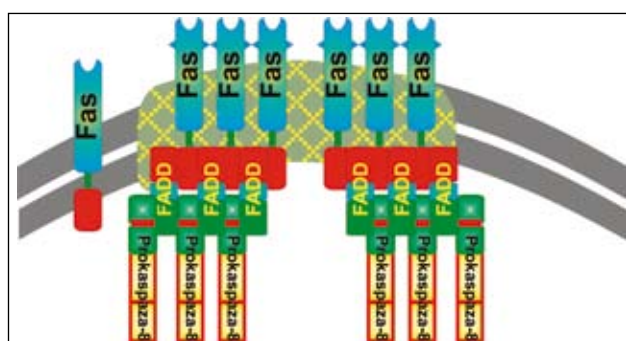
ceptorów wabików w normalnych komórkach. Ponieważ jednak około 50 proc. linii nowotworowych wykazuje oporność na TRAIL, zaprojektowano selektywne dla tego typu receptora warianty rekombinowanego TRAIL.



Rys. 5. Edelfosyna aktywuje Fas niezależnie od obecności ligandu Fas.



Rys. 6. Tratwa lipidowa w błonie komórkowej.



Rys. 7. Aktywacja Fas w wyniku tworzenia agregatów w raftach lipidowych.

W wyniku wymiany kilku aminokwasów w natywnym rekombinancie uzyskano selektywność w stosunku do TRAIL-R1 lub TRAIL-R2. W ten sposób otrzymano ludzkie, agonistyczne przeciwciała monoklonalne specyficzne w stosunku do receptorów TRAIL-R1 i TRAIL-R2 – mapatumumab (HGS-ETR1 – specyficzne dla TRAIL-R1), leksatutumumab (HGS-ETR2) oraz HGS-TR2J (oba specyficzne dla TRAIL-R2).

Związki te były bardzo skuteczne i selektywne w zwierzęcych modelach nowotworów. W badaniach klinicznych mapatumumab podano 49 pacjentom z zaawansowanym nowotworem litym.

Nie stwierdzono hepatoksyczości, jednak nie było również jednoznacznej odpowiedzi terapeutycznej, ponieważ nie zaobserwowano remisji a jedynie stabilizację choroby u 19 pacjentów (u 2 ponad 8 miesięcy). Podobne wyniki zaobserwowano po podaniu leksatumumabu. Spośród 37 pacjentów z zaawansowanym nowotworem litym u 12 nastąpiła stabilizacja choroby. Po podaniu mapatumumabu 14 pacjentom z opornym lub nawrotowym chłoniakiem zaobserwowano u 3 pacjentów remisję choroby, w tym u jednego całkowitą.

Badano również kombinacje TRAIL z innymi lekami przeciwnowotworowymi. Znalezione wiele kombinacji podwyższających skuteczność zarówno TRAIL jak i badanych leków. Stwierdzono również występowanie niekorzystnych kombinacji. Do korzystnych należało np. połączenie TRAIL z 5-fluorouracylem, paklitaksemem, bortezomibem, czy też z inhibitorami uwalniania czynnika transkrypcyjnego NFκB – PS-1145 (Millenium Pharm.) oraz AS602868 (Merck Serono). Połączenie TRAIL z cisplatyną dawało kombinację hepatotoksyczną.

Aktywacja receptora Fas

Znalezione również wiele związków selektywnie aktywujących receptor Fas. Szczególnie interesujące okazały się związki aktywujące ten receptor niezależnie od obecności jego natywnego ligandu (FasL). Do takich należy edelfosyna. Jej zaletą jest to, że komórki nowotworowe wychwytyją lek i ulegają apoptozie a normalne komórki – nie (Rys. 5).

Jest to pierwszy lek bezpośrednio aktywujący sygnał apoptotyczny w komórkach nowotworowych w wyniku selektywnej aktywacji Fas w tych komórkach. Mechanizm działania tego typu związków

polega na wychwytywaniu Fas i kolejnych cząsteczek leżących na szlaku sygnałowym apoptozy do tzw. tratwy lipidowej. Tratwy (rafty) lipidowe są to małe (10-200 nm), heterogenne, wysoce dynamiczne, wzbogacone w sterole i inne określone lipidy (głównie cholesterol, glikolipidy i sfingolipidy) domeny w błonie komórkowej (Rys. 6).

Pojawia się coraz większa liczba związków powodujących niezależną od FasL aktywację Fas w wyniku agregacji tego receptora w tratwie lipidowej (Rys. 7). Ta droga aktywacji wydaje się być atrakcyjnym sposobem zniszczenia komórki nowotworowej od wewnątrz, bez konieczności systemowej, dewastacyjnej aktywacji Fas w normalnych komórkach. Do związków o aktywności przeciwnowotworowej powodujących agregację Fas w tratwie lipidowej należą amplidyna, kamptotecyna, cisplatyna, resweratrol, winblastyna, etopozyd.

Receptory śmierci są interesującym, nie w pełni rozpoznany, celem molekularnym dla nowych grup leków przeciwnowotworowych. Jednakże warunkiem *sine qua non* dla szerszego klinicznego zastosowania jest selektywna aktywacja receptorów w komórkach nowotworowych. Jedną z przyczyn, bardzo zresztą istotną, jest duża toksyczność systemowa TNF-α oraz ligandu Fas. Odróżnia to te czynniki od ligandów receptorów dla czynnika TRAIL, które wykazują niską toksyczność. Ukie runkowanie wszystkich omawianych tu ligandów (TNF-α, FasL, TRAIL) na konkretne receptory w tkankach nowotworowych mogłoby zwiększyć ich aktywność przeciwnowotworową.

prof. dr hab. **ZDZISŁAW CHILMONCZYK**
e-mail: chilmon@il.waw.pl

Literatura

1. P. W. Dempsey¹, S. E. Doyle¹, J. Q. He¹, G. Cheng. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 193–209 (2003).
2. F. Mollinedo, C. Gajate. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: New targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 9, 51–73 (2006).
3. F. A. E. Kruyt. TRAIL and cancer therapy. *Cancer Letters* 263, 14–25 (2008).
4. H. Wajant, J. Gerspach, K. Pfizenmaier. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 55–76 (2005).

Pytania testowe

(Zaznacz jedną prawidłową odpowiedź)

1. Receptory śmierci są to:

- a. Receptory zawierające domeny śmierci i uruchamiające apoptotyczny proces śmierci komórki.
- b. Receptory uruchamiające proces śmierci organizmu.
- c. Receptory powodujące śmierć tkanki, w której się znajdują.

2. Nieselektywne ligandy receptorów śmierci nie mogą być rozpatrywane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe ponieważ:

- a. Jest ich zbyt mała ilość.
- b. Nie występują w tkankach nowotworowych.
- c. Wykazują dużą toksyczność systemową.

3. Potencjalne leki przeciwnowotworowe:

- a. Powinny być selektywne w stosunku do komórek nowotworowych i wykazywać się niską toksycznością.
- b. Mogą być nieselektywne ale powinny być nietoksyczne.
- c. Powinny wykazywać się dużą toksycznością i selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych.

(Odpowiedzi szukaj w numerze)

Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace zgłaszane do druku winny zawierać: cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa
- Prace powinny być zaopatrzone w krótkie streszczenie i zbiór podstawowych słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 20 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Prace (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinny być przesłane w formie elektronicznej, opatrzone następującymi danymi: nazwisko i imię, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu/faksu/e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda autorów na opublikowanie pracy w wersji elektronicznej „Gazety Farmaceutycznej”
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów
- Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania skrótów, niezbędnych poprawek stylistycznych i ew. zmniejszania objętości lub niepublikowania nadesłanych materiałów
- © Gazeta Farmaceutyczna.